



Académie de La Réunion

THÈSE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Épidémiologie
École doctorale : Sciences Technologies Santé

ÉPIDÉMIOLOGIE D'UNE ZOONOSE, LA LEPTOSPIROSE, DANS DEUX ÎLES DE L'Océan INDIEN, LA RÉUNION ET MAYOTTE - ÉTUDE COMPARÉE DU RÔLE DE DIFFÉRENTES ESPÈCES SAUVAGES ET DOMESTIQUES -

Amélie DESVARS

Docteur Vétérinaire
Diplômée en Parasitologie

Soutenue publiquement le 26 avril 2012, devant le Jury composé de :

Matthieu LE CORRE
Fahafahantsoa RAPELANORO RABENJA
Angéli KODJO
Alain MICHAULT
Koussay DELLAGI
Eric CARDINALE

Professeur, Université de La Réunion
Professeur, Université d'Antananarivo, Madagascar
Docteur ès Sciences, HDR, Vet AgroSup, Lyon
Docteur en Pharmacie, Biologiste, GHSR/CHR
Professeur, IRD/CRVOI
Vétérinaire, Docteur en Sciences, HDR, CIRAD/CRVOI

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

UMR Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Émergentes – CIRAD

« La science a certes quelques magnifiques réussites à son actif mais à tout prendre, je préfère de loin être heureux plutôt qu'avoir raison. »

Douglas Adams (Le guide du routard galactique)

« These minute filamental organisms dart through the soft medium with great rapidity, first in one direction and then in another, searching for a loose spot which they can pierce through. When encountering an impenetrable obstacle they reverse their progression and start anew. A striking sight is thus presented by these little vermicular organisms darting in all directions. »

Hideyo Noguchi, 1918 [1]

« Quelqu'un qui fait sa thèse sur la syphilis finit même par aimer le spirochète pâle. »

Umberto Eco (Le Pendule de Foucault)

Remerciements

Résumé

La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale dont les formes graves peuvent être mortelles pour l'Homme. Tous les mammifères sont susceptibles d'être réservoirs, la connaissance des hôtes de maintenance de *Leptospira* est un préalable essentiel à la mise en place de mesures de prévention. L'objectif de ce travail était l'étude épidémiologique de la leptospirose animale dans deux îles de l'Océan Indien : La Réunion et Mayotte.

À La Réunion, nous montrons que 81,6% des rongeurs, 38,8% des carnivores errants, 46,5% des ruminants d'élevage et 48,3% des porcs étaient séropositifs. De plus, 68,4% des rongeurs, 31,2% des musaraignes, 28,9% des carnivores errants, 20,2% des ruminants d'élevage et 15,6% des truies hébergeaient des leptospires au niveau rénal. Les charges bactériennes rénales varient en fonction des espèces. L'excrétion urinaire de leptospires a été démontrée chez le chien, le rat, la souris, et la chauve-souris.

À Mayotte, la séroprévalence est faible chez les lémuriers (2%) et les roussettes (10,2%), alors qu'elle est supérieure à 85% chez les chiens. La séroprévalence chez le rat noir est de 11,2% et 29,8% des rats sont porteurs rénal. Les résultats du séquençage montrent une grande diversité génétique des souches circulant chez le rat ainsi qu'une parfaite homologie avec celles isolées chez des patients mahorais, désignant le rat noir comme source de contamination pour l'Homme.

Ces résultats ont des applications en santé humaine et vétérinaire. Dans des zones tropicales comme La Réunion et Mayotte, la prophylaxie ne doit pas seulement se résumer à la lutte contre les rats, mais doit considérer l'écosystème dans sa globalité.

Mots-clés : leptospirose, zoonose, La Réunion, Mayotte, test de microagglutination, PCR quantitative, épidémiologie, séroprévalence, portage rénal, séquençage, mammifères.

Abstract

Leptospirosis is a widespread zoonosis which could be lethal for humans. All mammals could be reservoir and knowledge about the maintenance hosts is a necessary precondition for building up elaborating appropriate preventive measures. The aim of this work was to study the epidemiology of animal leptospirosis in two Indian Ocean islands: Reunion and Mayotte.

In Reunion Island, our results showed that 81.6% of rodents, 38.8% of stray carnivores, 46.5% of ruminant livestock, and 48.3% of swine were seropositive. Moreover, 68.4% of rodents, 31.2% of shrews, 28.9% of stray ~~car~~nivores, 20.2% of ruminant livestock, and 15.6% of sows carried *Leptospira* at the kidney level. Leptospiral renal load varied depending on the species. Furthermore, urinary shedding was proved for dogs, rats, mice, and bats.

In Mayotte, the seroprevalence was low in lemurs (2%) and flying foxes (10.2%) while it was over 85% in domestic and stray dogs. Seroprevalence in black rats was 11.2% and 29.8% of rats were renal carriers. DNA sequencing showed a great diversity among *Leptospira* strains circulating within rat population and a perfect homology with the strains isolated from ill patients in Mayotte. These results proved that black rat is the source of human contamination.

These data have practical applications in human and veterinary medicine. In tropical areas such as Reunion and Mayotte islands, prophylaxis~~a~~ should not only include rodent control, but should be considered at the ecosystem level.

Key words: leptospirosis, zoonosis, Reunion Island, Mayotte, microagglutination test, real-time quantitative PCR, epidemiology, seroprevalence, renal carriage, sequencing, mammals.

Sommaire

Chapitre I.....	1
Introduction générale.....	1
1. Importance sanitaire de la leptospirose	3
2. Aspects historiques.....	5
3. <i>Leptospira</i>	7
3.1. Nomenclature	7
3.2. Systématique	8
3.3. Caractéristiques biologiques	8
3.4. Mode de transmission.....	10
3.5. Classification antigénique (ou sérologique).....	11
3.6. Classification génomique	12
3.7. Le génome de <i>Leptospira</i> spp.	16
4. Problématique, objectifs et plan de la thèse	19
Chapitre II	23
La leptospirose humaine, expression clinique, diagnostic, principaux facteurs de risque.....	23
1. Expression clinique	25
1.1. Leptospirose anictérique	25
1.2. Leptospirose ictérique	26
1.3. Formes graves	26
1.4. Symptômes oculaires.....	29
1.5. Complications.....	29
1.6. Diagnostic différentiel.....	31
2. Diagnostic biologique	32
3. Facteurs de risque de leptospirose.....	34
3.1. Facteurs de risque liés au climat	34
3.2. Facteurs de risque socio-économiques	46
3.3. Autres facteurs de risque	47
3.3.1. Le sexe et l'âge du patient	47
3.3.2. L'exposition par les loisirs.....	48
Chapitre III	51
La leptospirose, une maladie (ré-) émergente ?	51
1. Emergence du syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS, Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome).....	54
2. Emergence liée aux nouvelles activités de loisirs et à la mondialisation des échanges.....	54
3. Emergence liée au changement climatique	56
4. Urbanisation, exode rural et pauvreté	57
5. Perte de biodiversité mammalienne	58
6. La leptospirose : une maladie émergente chez les animaux ?.....	59
Chapitre IV	61
La leptospirose animale.....	61
1. Rôle des animaux dans l'épidémiologie de la leptospirose : la notion d'hôte réservoir et d'hôte sensible	63
2. Signes cliniques chez quelques espèces domestiques	70
2.1. Chien	70
2.2. Chat	72
2.3. Cheval.....	72
2.4. Bovin.....	73
2.5. Ovin et caprin	74

2.6. Porcin	75
3. La leptospirose animale dans les zones insulaires tropicales	76
Chapitre V	99
Contextes géographiques, Matériels et Méthodes	99
1. L'île de La Réunion	101
1.1. Géographie et climat	101
1.2. La leptospirose humaine à La Réunion	104
Article 3 : Desvars A, Gigan J, Hoarau G, Gérardin P, Favier F, Michault A. 2011. Seroprevalence of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) assessed by microscopic agglutination test on paper disc-absorbed whole blood. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 85(6): 1097-1099.	105
2. L'île de Mayotte	109
2.1. Géographie et climat	109
2.2. La leptospirose humaine à Mayotte	110
3. Monographies des mammifères étudiés à La Réunion et à Mayotte	113
3.1. La Souris grise	114
3.2. Le Rat noir	114
3.3. Le Rat surmulot	115
3.4. La Musaraigne musquée	115
3.5. Le Tangué	116
3.6. Le Chat domestique	116
3.7. Le Chien	117
3.8. Le Cerf de Java	118
3.9. Le Bovin	118
3.10. La Chèvre	119
3.11. Le Mouton	120
3.12. Le Cochon	120
3.13. Le Petit Molosse de La Réunion	121
3.14. La Roussette	121
3.15. Le Lémur brun	122
4. Matériels et Méthodes	122
4.1. Capture des animaux et prélèvement du matériel biologique	122
4.1.1. Micromammifères	123
4.1.2. Carnivores errants	124
4.1.3. Animaux de rente	125
4.1.4. Microchiroptères	125
4.1.5. Roussettes (Mayotte)	126
4.1.6. Lémuriens (Mayotte)	126
4.1.7. Analyse semi-quantitative des urines par bandelettes urinaires	127
4.1.8. Zonage : Est versus Ouest (La Réunion)	127
4.2. Traitement des échantillons et des données collectées	128
4.3. Aspects réglementaires	129
4.3.1. La Réunion	129
4.3.1.1. Espèce protégée	129
4.3.1.2. Espèce gibier	129
4.3.1.3. Autorisation d'expérimenter sur animaux vivants	130
4.3.2. Mayotte	130
4.3.2.1. Espèces protégées	130
4.3.2.2. Chiens errants	131
4.4. Sérologie par test de micro-agglutination (MAT)	131

4.5. Extraction	134
4.6. PCR quantitative en temps réel (qPCR)	134
4.6.1. Définitions	134
4.6.2. Présentation de LipL32	134
4.6.3. Construction d'un contrôle positif et d'un standard pour la PCR quantitative	136
4.6.4 Construction d'un contrôle interne (CI) – Prélèvements de La Réunion.....	136
4.6.5. Détection du génome de <i>Leptospira</i> par qPCR	137
4.6.6. Détection du contrôle interne (CI) par qPCR.....	138
4.6.6.1. Prélèvements de La Réunion.....	138
4.6.6.2. Prélèvements de Mayotte	138
4.7. Culture de tissu rénal et d'urines sur milieu EMJH (animaux de La Réunion).....	139
4.8. Analyse des séquences d'ARNr 16S (prélèvements reins de rats noirs de Mayotte)	140
4.9. Analyses statistiques (animaux de La Réunion)	141
4.9.1. Comparaison des charges bactériennes rénales.....	141
4.9.2. Facteurs de risque d'infection par <i>Leptospira</i>	141
4.9.3. Corrélation entre l'infection rénale et l'analyse semi-quantitative des paramètres urinaires	144
Chapitre VI.....	145
épidémiologie de la leptospirose animale à La Réunion.....	145
1. Résultats	147
1.1. Bilan des captures.....	147
1.2. Résultats sérologiques	152
1.2.1. Rats noirs.....	153
1.2.2. Rats surmulots	153
1.2.3. Tenrec.....	154
1.2.4. Chats errants.....	154
1.2.5. Chiens errants.....	154
1.2.6. Bovins.....	154
1.2.7. Caprins, Cervidés et Porcins	155
1.2.8. Souris et Musaraigne	155
1.3. Prévalence du portage rénal (résultats des qPCR)	159
1.4. Résultats des cultures de reins et d'urines	161
1.5. Charge bactérienne rénale moyenne	162
1.5.1. Description des données.....	162
1.5.2. Conclusion.....	162
1.6. Facteurs de risque de séropositivité	167
1.6.1. Tableaux de contingence	167
1.6.2. Résultats des analyses statistiques.....	168
1.6.2.1. Bovins.....	168
1.6.2.2. Cerfs Rusa	170
1.7. Facteurs de risque de portage rénal	172
1.7.1. Tableaux de contingence	172
1.7.2. Résultats des analyses statistiques.....	173
1.7.3. Lien entre séropositivité et portage rénal	174
1.8. Analyses par bandelettes urinaires	176
1.8.1. Intérêt d'étudier les paramètres urinaires : éléments de bibliographie	176
1.8.2. Tableaux de contingence	178
1.8.3. Résultats des analyses statistiques.....	179
1.8.4. Discussion	179

2. Publication des résultats	181
3. Discussion sur l'épidémiologie et l'écologie de la leptospirose animale à La Réunion	182
3.1. Espèces hôtes de <i>Leptospira</i>	182
3.1.1. Rats (<i>Rattus rattus</i> et <i>Rattus norvegicus</i>) et souris domestiques (<i>Mus musculus</i>) ...	183
3.1.2. Insectivores : musaraigne musquée (<i>Suncus murinus</i>) et tanguie (<i>Tenrec ecaudatus</i>)	189
3.1.3. Chiens et chats errants	191
3.1.4. Animaux d'élevage	195
3.1.4.1. Bovins	196
3.1.4.2. Caprins	201
3.1.4.3. Cerfs Rusa	203
3.1.4.4. Porcins	205
3.1.4.5. Discussion sur les sérogroupes Panama et Pyrogenes	208
3.1.6. Petit Molosse de La Réunion (<i>Mormopterus francoismoutoui</i>)	211
3.2. Charge bactérienne rénale	213
3.3. Transmission de la leptospirose de l'animal à L'Homme à La Réunion	216
Chapitre VII	225
épidémiologie de la leptospirose animale à Mayotte	225
1. Problématique	227
2. Résultats	227
1.1. Bilan des captures	227
1.3. Publication des résultats majeurs	231
1.2. Résultats	232
3. Epidémiologie et écologie de la leptospirose à Mayotte	235
Chapitre VIII	238
Discussion générale	238
1. Discussion sur la méthodologie	240
1.1. Quelle(s) méthode(s) d'investigation ?	240
1.1.1. Test de microagglutination (MAT)	240
1.1.2. Amorces utilisées pour la qPCR	241
1.1.3. Comparaison des techniques	242
1.1.4. Amélioration de la technique de culture	244
1.2. Utilisation des séro-buvards	245
1.3. Méthode de quantification de la charge bactérienne rénale	246
2. Hypothèses sur les origines et la diversité des leptospires à La Réunion et à Mayotte par l'histoire du peuplement par les mammifères	248
2.1. Colonisation de La Réunion et Mayotte par les mammifères	248
2.2. Origines et diversité des <i>Leptospira</i> sur les deux îles	250
3. Co-évolution hôte-pathogène et <i>Leptospira</i>	254
5. Epidémiologie comparée de la leptospirose sur les deux îles	257
6. Conséquences en santé vétérinaire	263
4.1. Animaux domestiques	263
4.2. Animaux de rente	265
7. Intérêt de ce travail pour la santé humaine	268
7.1. Coût de la maladie	268
7.2. Population à risque et mesures de prévention	269
Chapitre IX	274
Conclusions et perspectives de recherche	274
Glossaire	277
Références bibliographiques	285

Liste des Annexes

ANNEXE A : Taxonomie des animaux étudiés à La Réunion et à Mayotte.

ANNEXE B : Photographies des espèces sauvages étudiées dans nos travaux de recherche.

ANNEXE C : Autorisation de capture temporaire avec relâcher sur place à des fins scientifiques de *Mormopterus francoismoutoui*.

ANNEXE D : Autorisation de capture et de prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée.

ANNEXE E : Arrêté n°029/DAF/def/2007 portant autorisation de capture, manipulation, de prélèvement et d'exportation de tout ou partie de spécimens d'espèces animales protégées à des fins scientifiques sur le territoire de la Collectivité Départementale de Mayotte.

ANNEXE F : Arrêté n°005/CAB/2007 portant régulation administrative des populations de chiens errants à Mayotte.

ANNEXE G : Certificats CITES d'autorisation d'exportation des prélèvements sur Lémuriens et Roussettes de Mayotte.

ANNEXE H : Certificats CITES d'autorisation d'importation des prélèvements sur Lémuriens et Roussettes de Mayotte.

ANNEXE I : Animaux de La Réunion - Résultats par espèce en fonction des données épidémiologiques.

ANNEXE J : Animaux de Mayotte - Résultats par espèce en fonction des données épidémiologiques.

ANNEXE K : Article - Le tanrec (*Tenrec ecaudatus*) réservoir animal de leptospires ?

Liste des Figures

Figure 1 : Cartographie de l'incidence annuelle globale de la leptospirose humaine dans le monde.....	4
Figure 2 : Diagramme schématique d'un spirochète illustrant la gaine de la membrane externe, le cylindre cellulaire protoplasmique et un flagelle périplasmique (d'après [30]).	9
Figure 3 : Voies de transmission de la leptospirose (d'après [50]).....	11
Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de <i>Leptospira</i>	14
Figure 5 : Diagramme montrant le nombre de gènes uniques et partagés entre <i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> et <i>L. biflexa</i> (d'après [38]).	17
Figure 6 : Facteurs impliqués dans la pathogénie de l'insuffisance rénale aiguë lors d'infection par <i>Leptospira</i> (d'après [92]).	27
Figure 7 : Nature biphasique de la leptospirose et investigations cliniques pertinentes aux différents stades de la maladie (d'après [13]).	34
Figure 8 : Le continuum hôte-pathogène.	60
Figure 9 : Représentation simplifiée des réponses immunitaires possibles chez un animal infecté par <i>Leptospira</i>	69
Figure 10 : Poumon de chien atteint d'hémorragie pulmonaire aiguë diffuse sévère.	71
Figure 11 : La Réunion et Mayotte dans le contexte régional Océan Indien.	102
Figure 12 : Géographie de La Réunion.	102
Figure 13 : Altitude – Climat : coupe schématique de l'île (Saint Gilles - Saint Benoît) [415].	104
Figure 14 : L'île de Mayotte.	110
Figure 15 : Distribution des cas du séro groupe Mini (ligne continue) par rapport au nombre total de cas de leptospirose à Mayotte (histogramme bleu), entre 1998 et 2009 (d'après [73]).	111
Figure 16 : Arbre phylogénique des isolats de <i>Leptospira</i> (n=95) basé sur les séquences de gènes Multiple Locus Sequence Typing (MLST) [228].	112
Figure 17 : Arbre couvrant de poids minimal (Minimum Spanning Tree, MST) de 372 souches de <i>Leptospira</i> , incluant des souches de Mayotte et des souches précédemment décrites [228].	113
Figure 18 : Poste de piégeage composé d'une souricière INRA et d'un piège Manufrance®.	124
Figure 19 : Prélèvement sanguin sur buvard.	124
Figure 20 : Île de La Réunion : carte des précipitations moyennes annuelles [437].	128
Figure 21 : Microscopie électronique après immunomarquage de la protéine LipL32 par antisérum anti-LipL32 à l'or colloïdal à la surface de <i>L. kirschneri</i>	135
Figure 22 : Lieux de capture des différents animaux étudiés (prélèvements de 2009).	147
Figure 23 : Types d'environnements explorés pour la capture de micromammifères à La Réunion.	148
Figure 24 : Séroprévalence par espèce et intervalle de confiance à 95%.	153
Figure 25 : Nombre d'animaux séropositifs par séro groupe et par espèce (animaux de La Réunion).	156
Figure 26 : Prévalence du portage rénal de <i>Leptospira</i> , par espèce, et intervalle de confiance à 95%.	160
Figure 27 : Prévalence de l'excrétion urinaire par espèce évaluée par qPCR ciblant le gène <i>lipL32</i>	160
Figure 28 : Cartographie des résultats de charge bactérienne rénale par espèce.	165

Figure 29 : Poids des rats noirs adultes et jeunes en fonction de la charge bactérienne rénale ($\ln[x+1]$), droite de régression et équation de la droite.	166
Figure 30 : Observation au microscope électronique à balayage d'une section de tissu rénal de <i>R. norvegicus</i> 28 jours après infection par 108 leptospires (grossissement x5000) [475].	215
Figure 31 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 173 animaux séropositifs à La Réunion (prélèvements faits en 2009).	219
Figure 32 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 423 patients diagnostiqués à La Réunion entre 1998 et 2009 (données du CNRL).	219
Figure 33 : Voies présumées de transmissions rurales de <i>Leptospira</i> à La Réunion.	221
Figure 34 : Voies présumées de transmissions sylvatiques de <i>Leptospira</i> à La Réunion.	222
Figure 35 : Voies présumées de transmissions urbaines de <i>Leptospira</i> à La Réunion.	223
Figure 36 : Capture et prélèvements sur lémurs bruns et roussettes à Mayotte (ChikAni, 2007).	228
Figure 37 : Cartographie de Mayotte présentant les lieux de capture des animaux (Carte S. Girard, ADEM-GESAM/CIRAD).	230
Figure 38 : Proportion des différents sérogroupes par espèce et catégorie chez les animaux étudiés à Mayotte.	234
Figure 39 : Séquences nucléotidiques du gène <i>lipL32</i> de <i>L. interrogans</i> sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130 (FioL1-130) et <i>L. borgpetersenii</i> souche 200801929 (Lborg1929) [462].	242
Figure 40 : Origine géographique des mammifères de La Réunion et de Mayotte (d'après [408]).	250
Figure 41 : Représentation schématique du phénomène de co-évolution : réciprocité des changements dus à la sélection dans une espèce (hôte ou pathogène) qui imposent la sélection de changements dans l'autre espèce (pathogène ou hôte respectivement).	257
Figure 42 : Sérogroupes identifiés par MAT chez les animaux de deux îles de l'Océan Indien.	260
Figure 43 : Exemple de zone attractive pour les rats dans une exploitation bovine.	267

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Incidence annuelle de la leptospirose dans quelques pays du monde (d'après [4]).	4
Tableau 2 : Nombre et répartition des sérovars dans les 23 sérogroupes et les sept espèces pathogènes.	15
Tableau 3 : Résumé des caractères principaux des génomes des <i>Leptospira</i> pathogènes et saprophytes (d'après [38]).	18
Tableau 4 : Synthèse des signes cliniques de la leptospirose (d'après [85]).	31
Tableau 5 : Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de <i>Leptospira</i> (d'après [73, 286]).	64
Tableau 6 : Températures en fonction de l'altitude à La Réunion (d'après [411]).	103
Tableau 7 : Souches en culture (milieu EMJH) utilisées pour les analyses sérologiques et raisons d'inclusion dans le panel pour la sérologie.	132
Tableau 8 : Souches utilisées pour le MAT sur les sérums des animaux de Mayotte [228].	133
Tableau 9 : Amorces et sondes utilisées pour les qPCR.	139
Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR nichée.	140
Tableau 11 : Animaux prélevés à La Réunion en 2009 et 2010.	150
Tableau 12 : Types de prélèvements effectués par espèce.	151
Tableau 13 : Séroprévalence et intervalle de confiance de la séroprévalence pour les espèces animales étudiées à La Réunion.	152
Tableau 14 : Résumé des résultats sérologiques par espèce et par séro groupe.	157
Tableau 15 : Titres minimum et maximum obtenus par MAT pour chaque séro groupe, par espèce.	157
Tableau 16 : Résultats détaillés de séroprévalence, minimum et maximum des titres en anticorps.	158
Tableau 17 : Prévalence du portage rénal chez les animaux étudiés à La Réunion et intervalle de confiance à 95% (IC95%).	159
Tableau 18 : Moyenne et écart-type de la charge bactérienne rénale par espèce ($\ln[x+1]$).	162
Tableau 19 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR sur rein chez les carnivores domestiques.	167
Tableau 20 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR sur rein chez les rongeurs.	167
Tableau 21 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR sur rein chez les tenrecs.	167
Tableau 22 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, le sexe, l'âge, le type d'élevage, le résultat de la qPCR sur rein et la race chez les bovins.	167
Tableau 23 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, le sexe, et le résultat de la qPCR sur rein chez les caprins.	168
Tableau 24 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la qPCR sur rein chez les cerfs.	168
Tableau 25 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique et le portage rénal chez les porcins.	168
Tableau 26: Facteurs de risque de séropositivité parmi les différentes espèces étudiées.	171
Tableau 27 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie pour les carnivores domestiques.	172
Tableau 28 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie pour les rongeurs.	172

Tableau 29 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, le sexe, l'âge et le lieu de capture pour les musaraignes.....	172
Tableau 30 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, le sexe, l'âge, le type d'élevage, la localisation du dernier élevage, le résultat de la sérologie et la race pour les bovins.	172
Tableau 31 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, le sexe et le résultat de la sérologie pour les caprins.	173
Tableau 32 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la qPCR sur rein pour les cerfs.....	173
Tableau 33 : Facteurs de risque d'infection rénale par <i>Leptospira</i> (qPCR sur rein positif) parmi les différentes espèces étudiées.	175
Tableau 34 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et l'espèce pour les quatre espèces étudiées.	178
Tableau 35 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une hématurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).	178
Tableau 36 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une cétonurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).	178
Tableau 37 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence de nitrites dans les urines, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).	178
Tableau 38 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une leucocyturie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).	179
Tableau 39 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une protéinurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).	179
Tableau 40 : Espèces génomiques, sérovars, souches de référence et origine des souches de <i>Leptospira</i> appartenant au sérogroupe Pyrogenes (d'après [9]).	210
Tableau 41 : Animaux prélevés à Mayotte en 2007.....	229
Tableau 42 : Motif de la consultation vétérinaire pour les chiens domestiques échantillonnés (données fournies par les vétérinaires).	229
Tableau 43 : Séroprévalence de la leptospirose chez les animaux étudiés à Mayotte et intervalle de confiance à 95% (IC95%).	232
Tableau 44 : Résultats bruts du MAT pour les animaux de Mayotte.....	233
Tableau 45 : Résultats comparés pour trois espèces animales à La Réunion et à Mayotte, les chiens, les rats noirs, les bovins.	257
Tableau 46 : Confort des résidences à Mayotte et à La Réunion.	259

Liste des Abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique.
AIC :	Critère d'Information d'Akaike (Akaike Information Criterion).
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché.
ARN :	Acide RiboNucléique.
ARNr :	Acide RiboNucléique ribosomique.
BET :	Bromure d'éthidium.
CHR :	Centre Hospitalier Régional.
CI :	Contrôle Interne.
CIRAD :	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.
CITES :	Convention on International Trade in Endangered Species.
CIVD :	Coagulation Intravasculaire Disséminée.
CNPN :	Centre National de Protection de la Nature.
CNRL :	Centre National de Référence des Leptospires.
Cq :	Cycle de quantification.
DAF :	Direction de l'Agriculture et de la Forêt.
DIREN :	Direction Régionale de l'Environnement.
DOM :	Département d'Outre-Mer.
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
EMJH :	Ellinghausen - McCullough modifié par Johnson et Harris.
GHSR :	Groupe Hospitalier Sud Réunion.
HRM :	High Resolution Melting.
IC 95% :	Intervalle de Confiance à 95%.
IgG :	Immunoglobuline de type G.
IgM :	Immunoglobuline de type M.
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique.
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement.
JORF :	Journal Officiel de la République Française.
Da :	Dalton (kDA = kiloDalton).
LipL32 :	Lipoprotéine L32.
LPHS :	Leptospirosis-associated Pulmonary Haemorrhage Syndrome.
LPS :	Lipopolysaccharide.
MAT :	Microscopic Agglutination Test (test de microagglutination microscopique).
MIQE :	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
MLST :	Multi Locus sequence Typing.
MLVA :	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis.
na :	Not available (non disponible).
nd :	Non déterminé.
ns :	Non significatif.
OR :	Odds Ratio.
PBS :	Phosphate Buffered Saline.
PCR :	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne).
qPCR :	Real-time Quantitative PCR.
SPHS :	Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome.
TLR :	Toll-Like Receptor.
VNTR :	Variable Number Tandem Repeat.
VZV :	Varicella-Zoster Virus.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

1. Importance sanitaire de la leptospirose

La leptospirose est une maladie zoonotique ayant un impact significatif sur la santé humaine dans de nombreuses régions du globe, en particulier en Amérique du Sud et en Asie. La maladie peut présenter des formes sévères voire mortelles comme le syndrome de Weil ou le syndrome d'hémorragie pulmonaire sévère. L'incidence véritable de la leptospirose est méconnue. Elle est estimée entre 0,1 et 1 cas pour 100 000 habitants par an dans les zones tempérées et ce chiffre peut atteindre 10 à 100 cas pour 100 000 habitants en zones tropicales (**Figure 1, Tableau 1**). Lors d'épidémie, l'incidence annuelle peut être supérieure à 10 cas pour 100 000 habitants. Le nombre de cas de leptospirose est sous-estimé pour diverses raisons, comme par exemple la difficulté du diagnostic différentiel avec d'autres maladies endémiques s'exprimant aussi par un syndrome grippal, le manque de laboratoires de diagnostic dans certaines régions ou la difficulté de son diagnostic biologique [2]. La majorité des cas diagnostiqués présentent des manifestations sévères, pour lesquelles la mortalité atteint voire dépasse 10% [3].

Les populations les plus sévèrement touchées sont aussi les plus pauvres, notamment les populations des zones rurales ou les populations des favelas des grandes agglomérations sud-américaines. L'infection du seul travailleur d'une famille peut réduire de façon dramatique le revenu familial ; en outre, cette situation peut se compliquer de l'incapacité des autres membres de la famille à travailler par le simple fait qu'ils s'occupent du malade. Les coûts médicaux peuvent endetter une famille. Malgré ce constat, la leptospirose reste une maladie peu prise en compte par les pouvoirs publics.



Figure 1 : Cartographie de l'incidence annuelle globale de la leptospirose humaine dans le monde.
Les couleurs représentent l'incidence, par ordre décroissant: rouge, rose, vert, jaune. L'orange désigne les zones avec une incidence probablement élevée, mais non estimée. Le blanc représente les pays pour lesquels il n'existe pas de donnée [4].

Tableau 1 : Incidence annuelle de la leptospirose dans quelques pays du monde (d'après [4]).

Rang	Pays	Incidence annuelle pour 100 000 habitants	Autres pays	Incidence annuelle pour 100 000 habitants
1	Seychelles	43,21	Biélorussie	0,34
2	Trinidad et Tobago	12,04	Bulgarie	0,37
3	Barbados	10,03	Chili	0,16
4	Jamaïque	7,8	Colombie	0,16
5	Costa Rica	6,72	République Tchèque	0,18
6	Sri Lanka	5,4	France	0,39
7	Thaïlande	4,89	Allemagne	0,07
8	Salvador	3,58	Grèce	0,3
9	Nouvelle-Zélande	2,6	Honduras	0,31
10	Uruguay	2,5	Hongrie	0,31
11	Cuba	2,47	Irlande	0,22
12	Nicaragua	2,33	Italie	0,07
13	Croatie	1,73	Lituanie	0,22
14	Russie	1,72	Mexique	0,1
15	Ukraine	1,53	Pays-Bas	0,19
16	République Dominicaine	1,38	Panama	0,13
17	Brésil	1,28	Paraguay	0,19
18	Equateur	1,16	Serbie Montenegro	0,15
19	Argentine	0,95	Singapour	0,2
20	Roumanie	0,94	Corée du Sud	0,28

Pays pour lesquels aucune donnée n'est disponible mais dans lesquels la leptospirose est probablement endémique :

Inde, Malaisie, Bangladesh, Vietnam, Laos, Népal, Cambodge, Indonésie, Birmanie, Chine, Pérou, Haïti, Iran, Suriname.

Une étude rétrospective récente a souligné le rôle de la faune sauvage comme source de maladies infectieuses émergentes et leur augmentation depuis 1940. L'augmentation de la population humaine induit une augmentation de la demande alimentaire qui conduit à des pratiques d'agriculture intensive impliquant parfois un très grand nombre d'animaux, ou la mise en place de fermes de production multi-espèces au sein d'une même région. Ces pratiques facilitent les infections inter-espèces [5, 6].

En parallèle des altérations écologiques provoquées par les hommes, une augmentation exponentielle des conflits d'espace entre les hommes et la faune sauvage est observée. Elle est liée à l'augmentation de la population, du tourisme et des échanges, qui conduisent à exposer l'Homme à de nouveaux agents infectieux ou à l'exposer davantage à des agents déjà connus [5, 6, 7, 8].

2. Aspects historiques

"Leptospira" vient du grec "leptos" (fin) et du grec "speira" (boucle).

Dans la langue chinoise, des noms anciens existaient pour désigner la leptospirose, tels que "wei ni", ou "jaunisse des cultivateurs de riz", ou dans les provinces de Hunan et Sichuan "lo ya goz te". Certains champs étaient "tan hwan bi" ("champs hantés"), où un fantôme, un esprit pouvait provoquer la "jaunisse du champ de riz". Au Japon, les noms traditionnels de la maladie étaient "nanukayami" ou "nanokayami" ("fièvre des sept jours" ou "fièvre d'automne"). Ces fièvres étaient associées avec la saison, la profession, ou avec la région ("hasamiyami" dans le district de Hasamiyami). Plus tard, en Europe, au Japon, en Australie et ailleurs, des associations entre la maladie et la profession ou l'environnement ont été reconnues ("cane-cutter's disease"¹, "swine-herd's disease"², "Schlammfieber"³, "mud fever"⁴), longtemps avant que l'étiologie de la maladie ne soit connue [9]. Dans ces dénominations empiriques apparaissent déjà des éléments essentiels de l'épidémiologie de la leptospirose.

¹ Maladie des coupeurs de canne à sucre.

² Maladie des élevages de porcs.

³ Fièvre de la boue.

⁴ Fièvre de la boue.

On prête à Larrey la première description correcte de la "fièvre jaune", en 1812, parmi les troupes napoléoniennes à Héliopolis, lors du siège du Caire en 1800 [9]. La maladie décrite par Larrey était semblable à celle déjà connue sous le nom de "typhus icterodes" par les nosologues français et anglais, ou sous le nom de "vomito prieto" par les espagnols, et décrit comme "fièvre jaune" par Humboldt au Mexique en 1811 [9].

En 1886 à Heidelberg, Adolf Weil décrit pour la première fois un ensemble de signes et symptômes, aujourd'hui éponymiques du syndrome de Weil, forme clinique la plus connue de la leptospirose (son premier patient souffrait de saignement nasal, "nasenbluten", au second jour de la maladie) [10]. Néanmoins, il semble qu'un syndrome identique ait été décrit chez un égoutier plusieurs années auparavant [11]. Inada et Ido identifièrent l'agent causal 30 ans plus tard [12].

Il a été suggéré que *Leptospira interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae a été introduit en Europe de l'ouest au XVIII^e siècle lors de l'extension vers l'ouest de l'aire de répartition de *Rattus norvegicus* à partir de l'Eurasie [13]. Néanmoins, des descriptions d'un syndrome ictérique ont été retrouvées très tôt dans les écrits. Entre 1616 et 1619, une épidémie a fait des ravages dans la population d'Indiens d'Amérique. La maladie a probablement épargné les pêcheurs et commerciaux européens qui vivaient à proximité. Les manifestations cliniques les plus sévères étaient: fièvre, céphalées, épistaxis, jaunisse et lésions cutanées. Plusieurs hypothèses ont été émises sur les pathologies responsables de ces symptômes : la peste, la fièvre jaune, la petite variole, mais aussi la grippe, la varicelle, le typhus, la fièvre typhoïde, la trichinose, les méningites cérébrospinales ainsi que les infections systémiques par le virus de l'hépatite B (HBV) ou D (HDV). Récemment, des auteurs proposent la leptospirose comme cause de ces symptômes observés [14]. Les rongeurs réservoirs auraient été transportés par bateaux depuis l'Europe et auraient infecté les réservoirs animaux indigènes ainsi que les eaux douces. L'écologie locale et les pratiques de la vie quotidienne de la population autochtone (non partagées par les européens) auraient favorisé la contamination. La réduction de la population d'Indiens a pu être progressive, épisodique ou continue. Les modes de vie locaux exposant la population de façon permanente, la leptospirose est devenue hyperendémique dans la région, et seulement une fraction de la population a survécu [14].

Bien que Stimson ait démontré dès 1907 [15] par observation à la coloration argentique, la présence d'agrégats de spirochètes dans les tubules rénaux d'un patient mort de « fièvre jaune », cette observation pionnière a été ignorée pendant des années et ce n'est qu'en 1918 que Noguchi décrit la bactérie pour la première fois [1]. Les spirochètes présentant des extrémités en crochet, Stimson les a nommés *Spirochaeta interrogans* à cause de leur ressemblance avec un point d'interrogation.

L'agent étiologique de la leptospirose a donc été découvert "officiellement" en 1915 par deux équipes indépendantes au Japon et en Allemagne. Au Japon, Inada et Ido [16] ont mis en évidence les spirochètes mais aussi les anticorps spécifiques dans le sang de mineurs japonais atteints de jaunisse infectieuse. En Allemagne, deux équipes de médecins allemands, Uhlenhuth et Fromme [17] et Hubener et Reiter [18], ont détecté des spirochètes dans le sang de cobayes inoculés avec du sang de soldats atteints de "French disease" dans les tranchées du nord-est de la France. Après la publication en Europe du travail de Inada, la confirmation de la présence de la leptospirose dans les deux camps du front ouest a été rapidement faite [19, 20].

Peu après la découverte de l'agent de la leptospirose comme cause de la maladie de Weil au Japon, la même équipe a décrit le rôle du rat comme porteur de la bactérie [21]. Cette observation importante a permis la compréhension des principes épidémiologiques de transmission de la bactérie par un animal porteur et a ouvert la porte à la possibilité de mettre en place des mesures de contrôle de la maladie ainsi qu'à l'expérimentation sur les réservoirs animaux potentiels. Il a fallu de nombreuses années avant que d'autres animaux domestiques ou sauvages soient reconnus comme sources excrétrices de leptospires et que le caractère zoonotique de la maladie soit reconnu [9].

3. *Leptospira*

3.1. Nomenclature

A son congrès de 2002, the Committee on the Taxonomy of *Leptospira* of the International Union of Microbiological Societies a approuvé la nomenclature suivante pour les sérovars de *Leptospira* : le genre et l'espèce doivent être écrit en italique, le nom du sérovar ne doit pas être en italique et doit avoir une majuscule [22].

3.2. Systématique

Le genre *Leptospira* est un des genres de la famille des Leptospiraceae, ordre des Spirochaetales, classe des *Spirochaetes*, division ou phylum des "*Spirochaetes*", domaine ou empire des "*Bacteria*". L'ordre des spirochètes comprend quatre autres genres : *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, et *Borrelia* [23, 24].

Les spirochètes incluent un grand nombre de bactéries d'importance médicale, causant différentes maladies dont les plus connues chez l'Homme sont la syphilis (*Treponema pallidum*), la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), et la leptospirose (*Leptospira* spp.). Les spirochètes sont aussi des agents de maladie parodontales (*Treponema denticola*). Parmi les animaux de rente, *Brachyspira* (= *Serpulina*, *Treponema*) *hyodysenteriae* est l'agent de la dysenterie porcine (diarrhée hémorragique ou entérite hémorragique) et a une importance économique majeure. *Brachyspira pilosicoli* est associée à des diarrhées chez l'homme, chez des individus immunodéprimés [25]. Beaucoup de spirochètes sont des organismes libres dans l'environnement, comme par exemple les genres *Spirochaeta*, *Spirosymplokos*, ainsi que plusieurs *Leptospira* dont *L. biflexa* [26].

3.3. Caractéristiques biologiques

Les leptospires ont un diamètre de 0,2 µm et une longueur de 6 à 20 µm, avec des extrémités en crochet caractéristiques [9]. Les souches pathogènes ont un temps de génération d'environ vingt heures, tandis que les souches saprophytes ont une croissance plus rapide avec un temps de génération d'environ cinq heures [9]. Ces deux groupes ont aussi des besoins nutritionnels différents et se distinguent sur d'autres caractères phénotypiques. Par exemple, la croissance des souches pathogènes est inhibée par la 8-azaguanine (un analogue de la purine) alors que les souches saprophytes croissent normalement en présence de ce composé [27].

Les leptospires possèdent une double membrane externe lipidique, qui entoure la cellule bactérienne comme une gaine. L'espace entre la membrane cellulaire protoplasmique et cette gaine est appelé périplasme, son originalité tient du fait qu'il contient les flagelles périplasmiques ou endoflagelles (**Figure 2**), permettant la motilité [28, 29, 30]. Chez les Leptospiraceae (genres *Leptospira* spp. et *Leptonema* spp.) le diamètre des deux flagelles est d'environ 0,1 µm pour 10-20 µm de long [30]. Chez *Leptospira* un flagelle court est attaché à chacune des extrémités de la cellule et s'étend vers l'extrémité opposée [26, 30, 31].

Comme chez les bactéries Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS) est le composant lipidique principal de la couche externe de la membrane externe de *Leptospira* [32], il constitue son principal antigène [33], tandis que les lipoprotéines sont les protéines de surface de la membrane externe les plus abondantes et les plus exposées.

Le LPS est l'antigène le plus immunogène de *Leptospira* et est responsable de la spécificité sérovar/sérogroupe. Le LPS est généralement composé d'un lipide A, responsable de l'activité endotoxique et servant d'ancrage dans la membrane bactérienne, d'un core oligosaccharidique conservé, et d'un oligosaccharide ou polysaccharide appelé antigène O [34]. Un des facteurs clé contribuant à la sensibilité de l'homme à l'infection leptospirosique est vraisemblablement lié à l'incapacité du système immunitaire humain à détecter le LPS des leptospires *via* les récepteurs Toll-like 4 (TLR4) [35]. Cette incapacité est due à la structure inhabituelle du lipide A du LPS de *Leptospira* qui possède un unique phosphate méthylé, non retrouvé dans le lipide A d'autres bactéries [36]. Les cellules humaines peuvent détecter le LPS des leptospires, mais par les récepteurs TLR2 et non TLR4 [35]. Au contraire, le LPS de *Leptospira* est détecté par les récepteurs TLR2 et TLR4 murins [37], et TLR2 est aussi nécessaire à la reconnaissance des lipoprotéines telles que LipL32 [35].

L'absence de gènes codant pour des sphingomyélinases dans le génome de *L. biflexa* [38] et par conséquent l'absence de ces protéines dans la membrane externe de cette bactérie non pathogène [39] laisse supposer que ces protéines ont un rôle dans la virulence de la bactérie [40].

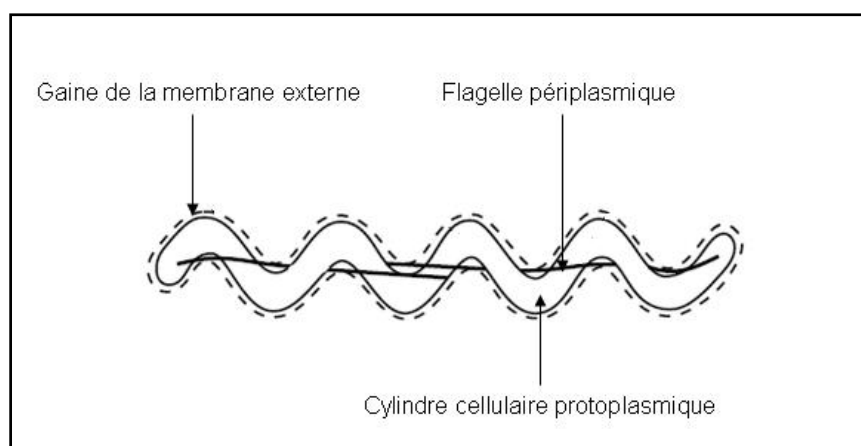


Figure 2 : Diagramme schématique d'un spirochète illustrant la gaine de la membrane externe, le cylindre cellulaire protoplasmique et un flagelle périplasmique (d'après [30]).

Les lipoprotéines ont souvent été nommées en fonction de leur poids moléculaire. On estime à plus de 300 le nombre de lipoprotéines potentielles, elles incluent les protéines

majeures de la membrane externe (*major outer membran proteins, MOMP*). Environ 12 protéines de la membrane externe de *Leptospira* ont été identifiées, dont la porine OmpL1 [41], l'antigène immunodominant LipL32 [42, 43], l'immunoglobulin-like repeat containing protein B (LigB) [44], LenA36, LenD36 et Loa22 [45], LipL41 [46] mais la grande majorité d'entre elles attendent encore d'être caractérisées [32]. Parmi ces protéines, OmpL1, LipL32 et LipL41 sont des antigènes majeurs de la réponse immunitaire humorale et sont la base de différentes techniques de diagnostic immunologique [47, 48, 49].

3.4. Mode de transmission

Les espèces mammaliennes infectées chroniquement excrètent les leptospires pathogènes dans leurs urines et servent donc de réservoirs pour la transmission de la bactérie (Figure 3). Les leptospires sont maintenus dans des environnements domestiques et sylvatiques grâce à la transmission entre populations d'animaux réservoirs. Chez ces animaux, l'infection induit le plus souvent un portage asymptomatique et chronique. Les leptospires peuvent infecter le bétail, les animaux domestiques et sauvages, et provoquer des symptômes divers (voir **Chapitre IV**). Le statut de réservoir varie en fonction des espèces animales.

La leptospirose est transmise à l'Homme par contact direct avec des animaux réservoirs ou par exposition à des eaux de surface ou un sol contaminés par leurs urines [50].
--

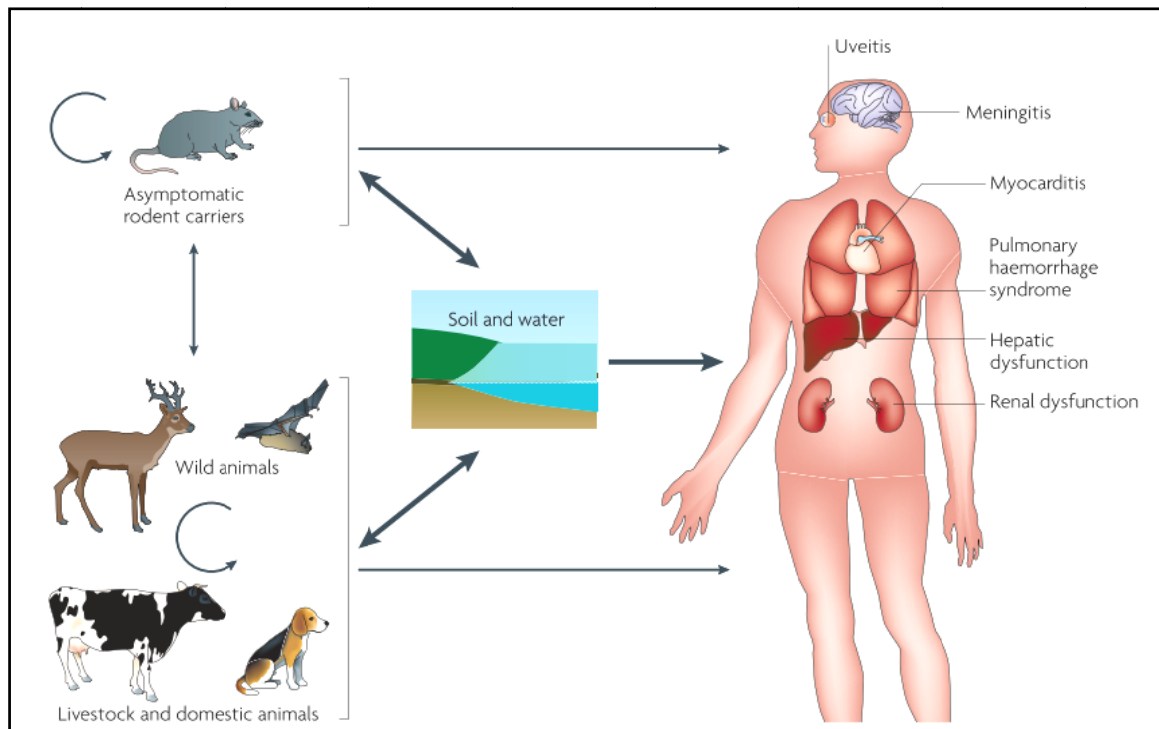


Figure 3 : Voies de transmission de la leptospirose (d'après [50]).

Actuellement, il n'y a aucune évidence que l'Homme contribue significativement à la contamination de l'environnement par *Leptospira*, mais des données récentes semblent montrer qu'un portage rénal durable serait tout de même possible [51]. En effet, l'Homme pourrait excréter des leptospires pendant une période dépassant une année : une étude a montré l'excrétion urinaire de leptospires pathogènes ou intermédiaires chez dix personnes asymptomatiques (c'est-à-dire sans épisode fébrile depuis au moins un an). Il est probable que cette observation soit la manifestation d'un portage rénal asymptomatique de *Leptospira*. Le nombre de leptospires retrouvées dans ces urines d'humains est en moyenne de 75 à 229 bactéries par ml [51]. L'étude suggère aussi que le portage rénal de longue durée de *Leptospira* est plus fréquent chez les femmes âgées que chez les hommes [51].

3.5. Classification antigénique (ou sérologique)

Avant 1989, le genre *Leptospira* était divisé en deux espèces, *L. interrogans* « sensu lato » (*s.l.*), qui regroupait toutes les souches pathogènes, et *L. biflexa s.l.*, regroupant toutes les souches saprophytes isolées de l'environnement. *L. biflexa s.l.* se différenciait de *L. interrogans s.l.* par sa croissance à 13°C en présence de 8-azaguanine. Ces appellations sont aujourd'hui considérées comme inexactes et doivent être abandonnées.

La classification antigénique (ou sérologique) est le reflet de l'expression des épitopes de surface au sein des antigènes du lipopolysaccharide (LPS). Ainsi, *L. interrogans s.l.* et *L. biflexa s.l.* sont divisées en nombreux sérovars définis d'après le test d'absorption croisée avec des antigènes homologues. D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé [52] : « Deux souches sont considérées comme appartenant à des types sérologiques distincts si, après absorption croisée par une quantité appropriée d'antigène hétérologue, l'antisérum de chaque souche conserve régulièrement, lorsqu'on l'éprouve de nouveau par rapport à la souche homologue, un titre au moins égal à 10% de celui qu'il accusait primitivement avec cette souche ».

Plus de 60 sérovars sont décrits pour les leptospires saprophytes, et plus de 260 pour les pathogènes [53]. Les sérovars proches antigéniquement sont regroupés en sérogroupes. La classification sérologique présente néanmoins de nombreux inconvénients, l'identification est coûteuse, lourde, lente (parfois plusieurs mois pour déterminer le sérovar) et complexe, ce qui la réserve à quelques laboratoires de référence [13]. De plus, les sérogroupes et même les sérovars regroupent le plus souvent des souches appartenant à des espèces génétiquement distinctes. Néanmoins, même si les sérogroupes n'ont qu'une valeur taxonomique limitée, il sont extrêmement utiles pour les études épidémiologiques [13].

Cette classification sérologique reste cependant très utilisée car elle est étroitement liée à la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de leptospirose (test de microagglutination ou MAT).

3.6. Classification génomique

Une espèce génomique (*genomospecies*) est définie comme des "souches ayant 70% ou plus d'homologie ADN-ADN et avec un ΔT_m de 5°C ou moins" [54].

La proximité des souches révélée par le MAT qui permet de définir des sérogroupes ne reflète pas toujours une proximité génomique: des sérovars appartenant au même séro groupe sont dispersés au sein de plusieurs espèces, et une même espèce peut comporter de nombreux sérogroupes.

Brenner *et al.* [55] ont montré que sur 303 souches de leptospires étudiées, représentant 268 sérovars groupés en 30 sérogroupes, seules les souches du séro groupe

Ballum sont confinées dans une seule espèce, *Leptospira borgpetersenii* [55] (**Tableau 2**, ne représentant que les espèces pathogènes).

Dans la classification génomique, le sous-groupe des espèces saprophytes, au nombre de six, forme la branche la plus ancienne du genre *Leptospira*. Un autre sous-groupe inclut les neuf espèces pathogènes tandis qu'une autre branche de l'évolution, de découverte plus récente, comprend les espèces appelées intermédiaires, pour lesquelles la pathogénicité n'a pas été clairement démontrée [50, 56] (**Figure 4**). Bien que *L. kmeyti* ait été isolé à partir du sol en Malaisie [57], l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S montre que cette souche appartient au cluster des espèces pathogènes. La variabilité de l'ADN entre les espèces est comprise entre 0,1 et 1,3% pour les espèces pathogènes, entre 0,3 et 2,9% pour les espèces intermédiaires, et entre 0 et 0,3% pour les espèces saprophytes [56].

Brenner *et al.* [55] émettent l'hypothèse que la distribution géographique des espèces est délimitée. Par exemple, les six souches identifiées de *L. alexanderi* sp. ont toutes été isolées en Chine. Soixante-deux souches parmi les 65 souches de *L. santarosai* proviennent d'Amérique du Nord et du Sud, de même que les 20 souches de *L. noguchii*. Presque la moitié des 91 souches de *L. interrogans* ont été isolées en Océanie (ce qui représente 70% des souches isolées dans cette région) [55]. Enfin, les 37 souches africaines (caractérisées par hybridation ADN-ADN dans l'étude de Feresu *et al.* [58]) appartiennent toutes soit à *L. kirschneri* soit à *L. santarosai*.

La classification génomique et la classification antigénique ne sont pas concordantes et plusieurs études ont montré que les sérogroupes ne peuvent être superposés aux groupes formés par une classification génétique [13] (ce qui suggérerait que les gènes qui déterminent les sérotypes pourraient être transférés latéralement entre les différentes espèces [50]).

Ainsi, un système de classification basé sur les ressemblances génétiques est utilisé conjointement avec la classification antigénique. Récemment, le séquençage du génome de souches appartenant à plusieurs espèces de *Leptospira* a permis l'introduction de diverses approches de génotypage des leptospires, dont les méthodes MLVA [59, 60, 61] ou MLST [62, 63, 64], qui pourraient devenir des méthodes standard de génotypage de *Leptospira* spp. comme c'est déjà le cas pour d'autres espèces bactériennes [65, 66]. Cette taxonomie moléculaire s'impose difficilement auprès des cliniciens et des spécialistes de la leptospirose malgré plusieurs avantages : reproductibilité, rapidité, faible coût. Enfin, les méthodes génétiques sont accessibles à un plus grand nombre de laboratoires car des réactifs sont

commercialisés et la nécessité de posséder une collection complète de sérovars est remplacée par la comparaison à des bases de données accessibles sur Internet.

Le sérovar a été une unité taxonomique historique très utile dans le contexte diagnostic. Cependant, dans une perspective de recherche, et spécialement si on tient compte de la génétique de la biosynthèse du LPS, ce taxon ne représente en aucun cas un groupe de souches avec une structure de LPS identique.

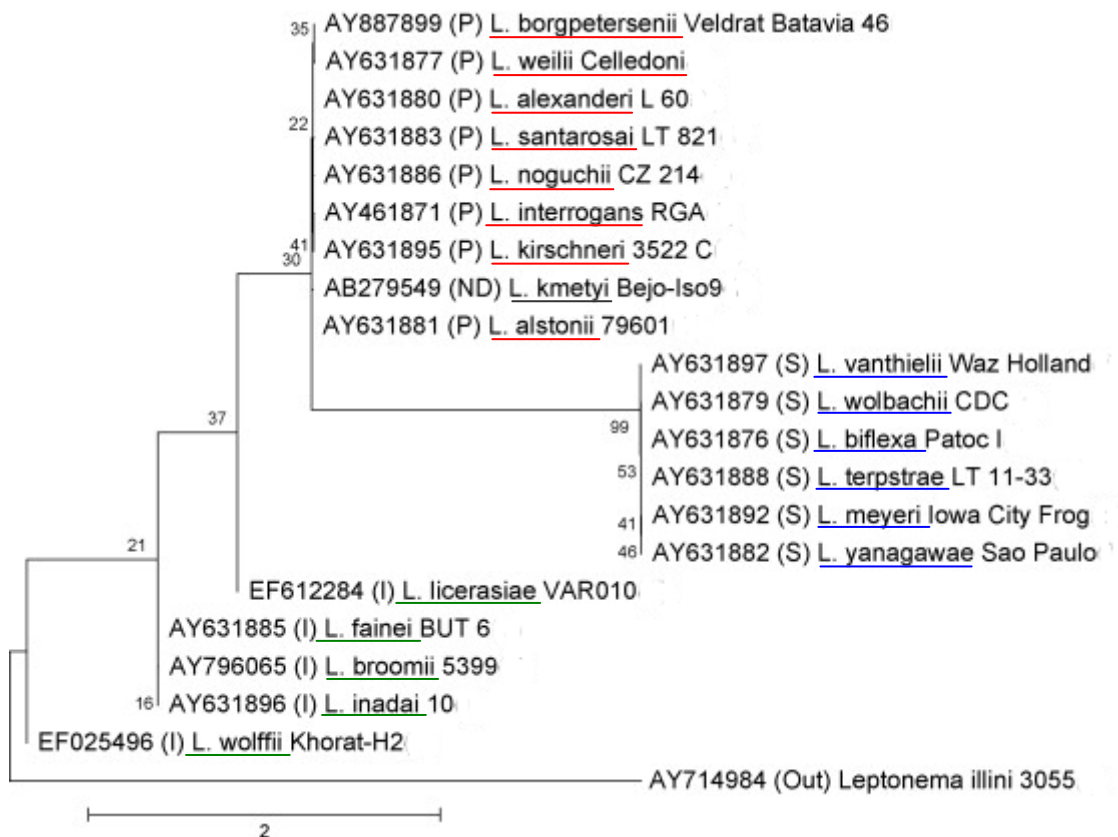


Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de *Leptospira*. L'arbre phylogénétique a été construit grâce à l'alignement de 1155 pb des séquences nucléotidiques du gène *rrs* de *Leptospira*. La méthode de Neighbor-joining a été utilisée (1000 bootstraps). Les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S groupent les souches en trois groupes majeurs correspondant aux espèces pathogènes (P), intermédiaires (I), saprophytes (S) ou non déterminées (ND). ND fait référence aux espèces non testées sur modèle animal ou non isolées à partir d'humains ou d'animaux. Les numéros d'accès des séquences utilisées sont indiqués, suivis de l'espèce et de la souche. L'arbre phylogénétique final a été obtenu en prenant *Leptonema illini* comme groupe externe pour enracer l'arbre. Les valeurs des bootstraps sont données en pourcentages. La barre d'échelle correspond à 2 substitutions pour 100 nucléotides (d'après [56]).

Tableau 2 : Nombre et répartition des sérovars dans les 23 sérogroupes et les sept espèces pathogènes.
(d'après Brenner *et al.* [55], restreint aux stricts pathogènes)

Sérogroupes	<i>L. interrogans sensu stricto</i>	<i>L. santarosai</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. noguchii</i>	<i>L. weilii</i>	<i>L. alexanderi</i>	Total
Australis	9		1	1	5			16
Autumnalis	7	1	1	5	1			15
Ballum			6					6
Bataviae	5	5	1	2	2			15
Canicola	12			3				15
Celledoni			2			3		5
Cynopteri		2		1				3
Djasiman	3			1	1			5
Grippotyphosa	4	1		4				9
Hebdomadis	2	8	3	2		1	2	18
Icterohaemorrhagiae	13		1	5				19
Javanica		3	10			3	1	17
Louisiana	1				2			3
Manhao						1	2	3
Mini	1	4	1			1	1	8
Panama					2			2
Pomona	4	2		3	1			10
Pyrogenes	8	5	2		1	1		17
Ranarum	1				1			2
Sarmin	1	3				1		5
Sejroë	10	5	8			1		24
Shermani		3			1			4
Tarassovi		12	7		1	3		23
Total	81	54	43	27	18	15	6	244

3.7. Le génome de *Leptospira* spp.

L'étude du génome des *Leptospira* a connu une grande avancée ces dix dernières années avec le séquençage complet du génome de représentants de deux espèces pathogènes, *Leptospira interrogans* [67, 68] et *L. borgpetersenii* [69], et de l'espèce saprophyte *L. biflexa* [38].

Le génome de *Leptospira* a un taux de (G+C) compris entre 35 et 41% et possède deux chromosomes circulaires d'approximativement 4 Mb et 300 kb. Un réplicon circulaire de 74 kb ainsi qu'un prophage circulaire nommé LE1 ont en plus été identifiés chez *L. biflexa* [38, 70, 71].

Une analyse comparative des génomes de *Leptospira* spp. (**Figure 5, Tableau 3**) montre des différences entre les espèces pathogènes et saprophytes. De plus, il existe aussi des différences génétiques importantes au sein même du groupe des espèces pathogènes [72].

La comparaison des protéines codées par les génomes de *L. interrogans*, *L. biflexa* et *L. borgpetersenii* révèle un squelette commun (« *core genome* ») de 2052 protéines pour le genre *Leptospira* [38]. Les génomes de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* contiennent respectivement environ 3400 et 2800 régions codantes (sans compter les transposases et les pseudogènes), parmi lesquelles 656 sont spécifiques des leptospires pathogènes et non retrouvées chez l'espèce saprophyte *L. biflexa*. Les fonctions de 59% de ces gènes sont inconnues, ce qui suggère l'existence de mécanismes de pathogénicité uniques au genre *Leptospira*.

L. biflexa survit exclusivement dans l'environnement et possède beaucoup plus de gènes codant pour des protéines impliquées dans les interactions avec l'environnement ou des protéines métaboliques que les espèces pathogènes [38]. *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* partagent 2708 gènes, 627 gènes et 265 gènes de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* respectivement ne sont pas partagés avec l'autre espèce pathogène. *L. interrogans* semble avoir conservé plus de gènes de son ancêtre saprophyte, dont la plupart lui permettraient de survivre dans le milieu extérieur [38]. *L. borgpetersenii* a un génome réduit, 3,9 Mb comparé à 4,6 Mb chez *L. interrogans*, et une plus grande proportion de transposases ou de pseudogènes, 20% comparé à 2% chez *L. interrogans*.

Ainsi, ces données suggèrent que *L. borgpetersenii* subit un processus de réduction et de spécialisation de son génome [69]. Cette réduction de taille du génome serait liée à une perte des capacités de *L. borgpetersenii* à survivre dans le milieu extérieur, et par conséquent

supporte l'hypothèse que le mode principal de transmission pour cette espèce pathogène se ferait directement d'animal à animal plutôt que *via* l'environnement [69].

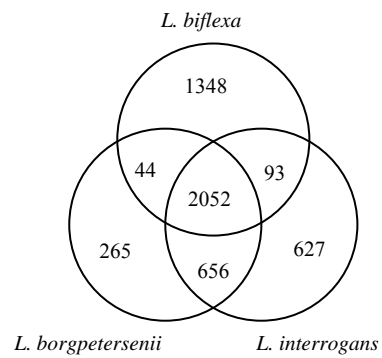


Figure 5 : Diagramme montrant le nombre de gènes uniques et partagés entre *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa* (d'après [38]).

Tableau 3 : Résumé des caractères principaux des génomes des *Leptospira* pathogènes et saprophytes (d'après [38]).

Caractères	<i>L. borgpetersenii</i> ¹		<i>L. interrogans</i> ²		<i>L. biflexa</i> ³			
	CI	CII	CI	CII	CI	CII	P74	Prophage LE-1
Taille (pb)	3 614 456	317 335	4 277 181	350 181	3 603 977	277 995	74 116	73 623
Taux de G+C (%)	41,0	41,2	35,1	35,0	38,9	39,3	37,5	38,5
Pourcentage de protéines codantes	80	80	74,9	75,5	92,3	93,3	90,9	93,4
Séquences codant pour des protéines								
Séquences codantes ⁴	2 607	237	3 105	274	3 268	266	56	82
Avec une fonction assignée	1 644	135	1 817	159	2 042	141	31	19
Avec une fonction hypothétique conservée	373	32	484	34	464	43	5	2
Avec une fonction hypothétique unique	590	70	804	81	762	82	20	61
Transposases	215	26	26	0	8	1	1	0
Pseudogènes	340	28	38	3	32	1	0	0
Gènes codant pour des ARN de transfert	37	0	37	0	35	0	0	0
Gènes codant pour des ARN ribosomiques								
23S	2	0	2	0	2	0	0	0
16S	2	0	2	0	2	0	0	0
5S	1	0	1	0	2	0	0	0

¹ *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo souche L550.

² *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Fiocruz.

³ *L. biflexa* sérovar Patoc souche Ames.

⁴ Non compris les transposases et pseudogènes.

4. Problématique, objectifs et plan de la thèse

La leptospirose est considérée comme une maladie émergente ou ré-émergente dans de nombreuses régions du monde. La leptospirose animale représente un enjeu sanitaire et économique important, car elle constitue un facteur de réduction de la productivité dans un cheptel infecté, compromettant ainsi la sécurité alimentaire et réduisant le revenu familial. Chez les animaux d'élevage, elle représente également un risque sanitaire du fait de son fort potentiel zoonotique.

Par conséquent, le contrôle de la leptospirose peut avoir un impact fort sur le développement d'une région ou d'un pays.

La leptospirose a été rapportée chez plus de 150 espèces mammaliennes [50]. La bactérie se maintient grâce à la colonisation chronique des reins des animaux porteurs. Un animal infecté peut montrer des symptômes de la maladie, mais il peut aussi être asymptomatique et excréter la bactérie dans ses urines, soit temporairement, soit pendant toute sa vie.

La prévalence des différents sérovars de *Leptospira* dans une population humaine est dépendante des populations de réservoirs animaux présentes localement, des sérovars qu'ils hébergent, des contacts entre l'Homme et la faune, du milieu, mais aussi des pratiques agronomiques et culturelles [73].

Les leptospires pathogènes sont dépendants pour leur survie des conditions environnementales, et d'un animal hôte réservoir, l'Homme étant un hôte accidentel.

L'étude de l'épidémiologie de la leptospirose animale permet d'émettre des hypothèses quant aux circuits de transmission inter-espèces, dont l'Homme. La connaissance des espèces animales (sauvages et domestiques) réservoirs permet la mise en place de mesures de prévention adéquates comme la lutte collective contre les rongeurs, la gestion de l'errance animale, la mise en place de "barrières" entre les zones urbaines, de plus en plus étendues, et la faune sauvage dont les territoires sont réduits par l'urbanisation croissante.

D'un point de vue économique, la connaissance de la séroprévalence et du portage rénal de la leptospirose chez les animaux de rente peut permettre de mettre en place des mesures de prévention physiques (élimination des eaux stagnantes, lutte contre les espèces

sauvages pouvant être en contact avec les animaux d'élevage...) mais aussi vaccinales (vaccin ciblé contre les souches spécifiques circulant dans une région ou un pays).

Les données concernant la maladie dans une région ne sont pas extrapolables à une autre, et les études doivent être conduites localement. Ce travail de thèse a eu pour objectif global l'étude de la leptospirose animale sur deux îles de l'Océan Indien, La Réunion et Mayotte.

Dans les îles de La Réunion et Mayotte, l'incidence de la maladie humaine est importante (respectivement 8,6 et 45,1 cas pour 100 000 habitant en 2009) et la leptospirose constitue un problème de santé publique majeur. A Mayotte, l'augmentation du nombre de c du séro groupe Mini et l'importance du nombre de souches locales isolées chez les patients [74] posent des questions épidémiologiques essentielles concernant le/les réservoir(s) de ces bactéries.

A ce jour, les travaux sur la leptospirose animale à La Réunion et Mayotte sont peu nombreux:

Tout d'abord, un rapport du Dr F. Moutou [75] de 1980, très détaillé, dresse la situation épidémiologique à La Réunion grâce à des prélèvements faits entre 1977 et 1979 sur des chiens, bovins, porcins, chevaux, et rats.

Publiée en 1983, une étude de Débarbat *et al.* [76] présente les résultats d'une enquête sérologique conduite en 1978-1979 chez des bovins et des chevaux.

La thèse de doctorat vétérinaire de H. Gares établit les principales causes d'avortement en élevage bovin laitier à La Réunion et montre que la leptospirose est un des facteurs importants d'avortement chez les bovins [77].

Enfin, un article de Sigaud *et al.* [78] présente la séroprévalence chez une espèce insectivore sauvage, le tangué.

Concernant Mayotte, nous n'avons connaissance que d'un seul travail sur la leptospirose animale, il s'agit de la thèse de doctorat vétérinaire d'A. Charton qui dresse un état des lieux succinct du statut sérologique de quelques espèces mahoraises vis-à-vis de la maladie [79].

Par conséquent, le premier objectif de ce travail de thèse était d'actualiser les données de séroprévalence de la maladie chez sept espèces domestiques et quatre espèces sauvages de La Réunion. A Mayotte, notre étude de séroprévalence a porté sur les chiens domestiques et

errants, ainsi que sur trois espèces sauvages commensales de l'homme, le rat noir, le lémur brun, et la roussette. Ces travaux nous ont permis d'établir 1/ la liste des espèces pouvant être en contact avec la bactérie, donc potentiellement l'excréter, et 2/ la diversité des sérogroupes circulants chez les animaux à La Réunion et Mayotte.

La recherche d'ADN génomique de *Leptospira* pathogènes dans les reins et les urines d'espèces animales par la technique d'amplification génique (PCR) n'avait jamais été réalisée à La Réunion, ni à Mayotte. L'originalité de notre travail de recherche a été d'établir la prévalence du portage rénal et/ou de l'excrétion urinaire de *Leptospira* chez les animaux de ces deux îles et de quantifier (par PCR quantitative) la quantité de bactéries portées au niveau rénal ou excrétées dans les urines.

La démarche adoptée pour ce travail a consisté en un important travail de terrain sur les deux îles pour la capture des animaux sauvages et leurs prélèvements ou autopsie. A La Réunion, la collecte des échantillons biologiques sur les espèces domestiques et de rente a été conduite à la fourrière de Tampon et à l'abattoir de Saint-Pierre.

Une partie conséquente de ce travail a été dédiée au travail de laboratoire, qui a été conduit au Laboratoire de Parasitologie-Bactériologie-Virologie et Hygiène du Groupe Hospitalier Sud Réunion, pour le conditionnement des échantillons, leur identification, et leur analyse.

Pour le travail sur les animaux de Mayotte, les échantillons, issus d'un précédent travail de terrain effectué pour l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA, projet ChikAni), ont été obtenus avec l'accord de l'INRA, et les analyses sérologiques ont été conduites à l'occasion d'un séjour d'un mois à l'Unité Postulante de Biologie des Spirochètes, Centre National de Référence de Leptospires (CNRL), de l'Institut Pasteur de Paris.

Ce présent travail constitue la première étape établissant le statut des animaux de La Réunion et de Mayotte vis-à-vis de la leptospirose et définissant les espèces potentiellement réservoirs de la maladie. Il se structure en neuf chapitres :

Dans le **Chapitre I**, nous avons décrit l'importance sanitaire de la leptospirose en tant que zoonose majeure au niveau mondial, et dressé un état des connaissances concernant l'agent pathogène.

Dans le **Chapitre II**, nous décrivons la maladie telle qu'elle se présente chez l'Homme, espèce sensible, les méthodes de diagnostic et les principaux facteurs de risque reconnus.

Le **Chapitre III** est une discussion sur le caractère émergent (ou ré-émergent) de la leptospirose.

Dans le **Chapitre IV** nous présentons la leptospirose animale, et ses signes cliniques chez les principales espèces domestiques et de rente. Pour conclure ce chapitre, nous présentons une synthèse bibliographique des recherches conduites sur la leptospirose animale dans les zones insulaires tropicales.

Le **Chapitre V** présente le contexte géographique de nos travaux de recherche, les îles de La Réunion et Mayotte et le protocole suivi pour notre étude.

Les **Chapitres VI et VII** exposent et discutent les résultats majeurs de nos travaux de recherche. Les études conduites à La Réunion et Mayotte, assez similaires dans leurs protocoles, ont permis d'établir la diversité des sérogroupes circulant sur les deux îles, la séroprévalence chez un grand nombre d'espèces animales, et la prévalence du portage rénal et de l'excrétion urinaire (à La Réunion) chez ces espèces.

Les données épidémiologiques et collections d'échantillons biologiques ainsi établies constituent les bases d'un futur travail de génotypage des ADN de *Leptospira* qui permettra d'émettre des hypothèses solides quant aux circuits de transmission de la bactérie sur ces îles.

Le **Chapitre VIII** présente une discussion générale portant dans un premier temps sur la méthodologie employée pour nos recherches. Dans un second temps, nous discutons des origines et de la diversité des leptospires à La Réunion et Mayotte, puis, nous discutons la notion de co-évolution hôte-pathogène dans le cas de *Leptospira*. Enfin, nous comparons les résultats obtenus sur ces les deux îles étudiées et discutons des conséquences pratiques en santé vétérinaire et humaine.

Pour terminer, le **Chapitre IX** synthétise les résultats de nos recherches sur la leptospirose animale à La Réunion et Mayotte, et ouvre sur des nouvelles perspectives de recherche soulevées par les données obtenues au cours de ce travail.

CHAPITRE II

LA LEPTOSPIROSE HUMAINE, EXPRESSION CLINIQUE, DIAGNOSTIC, PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE

1. Expression clinique

Après la contamination par les muqueuses ou la peau abrasée en contact avec de l'eau ou un sol contaminé par des leptospires excrétés *via* les urines d'animaux infectés ou directement *via* ces urines elles-mêmes, les leptospires établissent rapidement une infection systémique en traversant les barrières tissulaires et par invasion du système sanguin [9].

La majorité des infections leptospirosiques sont asymptomatiques ou subcliniques [13].

1.1. Leptospirose anictérique

La période d'incubation moyenne est de 10 jours (extrêmes : 2-30 jours) [9, 50]. La phase aigüe appelée "leptospiémique" dure de 4 à 9 jours et commence par une fièvre brutale, des céphalées, des myalgies, douleurs abdominales, anorexie, nausées et vomissements, et des suffusions conjonctivales (rougeur sans exsudat purulent). D'autres signes moins communs peuvent être observés, tels qu'une lymphadénopathie, une splénomégalie, ou une hépatomégalie.

La phase immune ou "leptospirurique", apparaît en même temps que les immunoglobulines de type M (IgM) [13]. Cette phase dure généralement 4 à 30 jours. Une leptospirurie supérieure à 140 jours a néanmoins été observée chez un patient atteint de forme grave [80].

La méningite aseptique (avec ou sans symptômes) est caractéristique de la phase immune de la maladie, et apparaît dans moins de 25% des cas [13]. Dans les régions endémiques, une proportion significative des cas de méningites aseptiques peut être reliée à la leptospirose [81]. Les patients symptomatiques présentent un mal de tête intense, bitemporal et frontal, s'accompagnant parfois de délire. Les malades présentent une hyperleucocytose restant généralement en-dessous de 500 cellules/mm³. Dans le liquide cérébro-spinal, le taux de protéines est modérément élevé, entre 50 et 100 mg/ml, tandis que la concentration de glucose reste normale [82, 83, 84].

1.2. Leptospirose ictérique

La leptospirose ictérique est une maladie grave dans laquelle l'évolution clinique est souvent rapide. En plus des symptômes aigus déjà décrits, d'autres apparaissent, tel qu'un ictère (caractérisé par un taux élevé de bilirubine sérique), une insuffisance rénale, une arythmie cardiaque, des symptômes pulmonaires, des suffusions conjonctivales avec ou sans hémorragies, une photophobie, des douleurs oculaires, une rhabdomyolyse (objectivée par une augmentation de la créatinine sérique), une adénopathie et une hépato-et/ou une splénomégalie. On observe une augmentation de la concentration sérique des marqueurs de dysfonctionnement hépatiques (transaminases et phosphatase alcaline) et rénaux (créatinine et urée), et une thrombocytopénie apparaît dans plus de 50% des cas [13]. Les douleurs abdominales ne sont pas des signes fréquents, mais peuvent indiquer une pancréatite [9, 13, 85, 86].

1.3. Formes graves

La forme la plus connue qui se développe après la phase aigüe est le syndrome de Weil, potentiellement fatal, qui s'accompagne d'une combinaison de symptômes rénaux, d'insuffisance hépatique, et d'hémorragies [9, 13, 85, 86, 87]. Dans les cas de formes sévères, le taux de mortalité va de 5% à 40% [9, 13, 88, 89, 90, 91]. Le dysfonctionnement rénal (**Figure 6**) est caractérisé initialement par une insuffisance rénale non-ologurique et hypokaliémique très évocatrice. Dans plus de 50% des cas, on retrouve une protéinurie modérée, une leucocyturie et une hématurie [92].

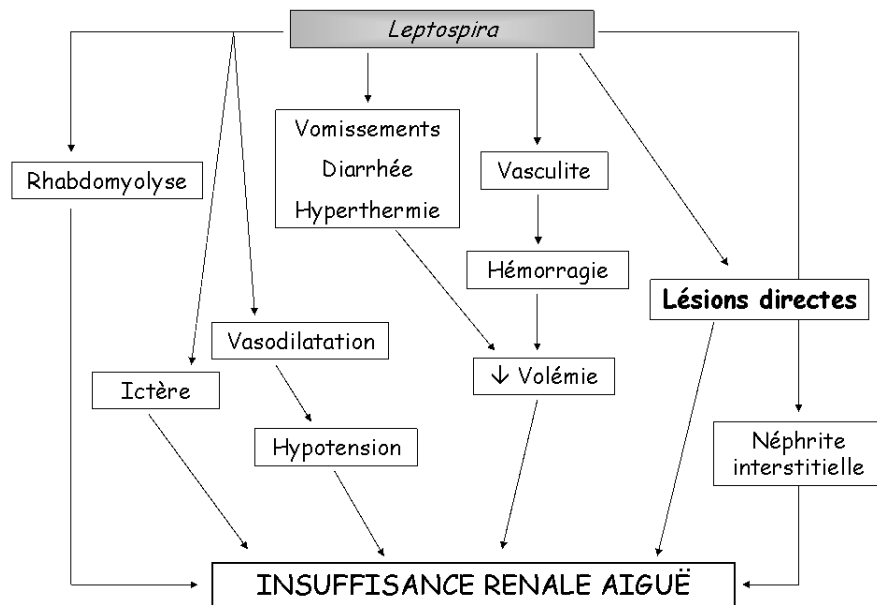


Figure 6 : Facteurs impliqués dans la pathogénie de l'insuffisance rénale aiguë lors d'infection par *Leptospira* (d'après [92]).

Le syndrome d'hémorragie pulmonaire sévère ou syndrome d'hémorragie pulmonaire associée à la leptospirose (*severe pulmonary hemorrhagic syndrome, SPHS* ou *leptospirosis-associated pulmonary haemorrhage syndrome, LPHS*) peut être une manifestation majeure de l'infection et apparaît en l'absence d'insuffisance hépatique ou rénale [93]. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en Corée et en Chine [94] et a été largement médiatisée après un important épisode clinique au Nicaragua en 1995 [93]. Ensuite, le LPHS a émergé comme une cause majeure de fièvre hémorragique dans les pays en développement [95, 96].

La principale lésion décrite dans le LPHS est un dommage aux endothéliums vasculaires provoquant des hémorragies alvéolaires [97]. A Séoul (Corée du Sud), dans une cohorte de 58 patients atteints de leptospirose, 37 (64%) avaient des signes pulmonaires visibles par radiographie. Trois caractéristiques radiographiques ont pu être relevées chez ces patients : des petits nodules denses (21 patients, 57%), des aires de consolidations confluentes (6 patients, 16%), et une densité diffuse, opaque, mal définie (10 patients, 27%) [98]. Par ailleurs, l'atteinte interstitielle était la plus fréquente des anomalies observées chez 134 patients atteints de leptospirose et hospitalisés à La Réunion [99].

Récemment, plusieurs études ont observé un dépôt linéaire d'immunoglobulines et du complément le long de la membrane basale alvéolaire et dans les espaces intra-alvéolaires des tissus pulmonaires affectés [50, 100], ce qui suggère l'implication d'un processus auto-immun [24]. Néanmoins, les hémorragies pulmonaires sont probablement multifactorielles et de

récentes études réfutent l'implication d'un phénomène auto-immun [101]. En effet, le dépôt d'anticorps et du complément sur les septums alvéolaires n'est pas une observation constante dans les cas de leptospirose humaine [102]. La pathogénie de l'affection pulmonaire leptospirosique est actuellement étudiée et deux principaux mécanismes apparaissent à ce jour comme les plus probablement impliqués: l'action de toxines et la réponse immunitaire de l'hôte [103].

L'incidence de l'atteinte pulmonaire dans les cas de leptospirose varie de 20% à 70% et le nombre de diagnostics de leptospirose liées à cette expression clinique est en augmentation ces dernières années [103]. Par ailleurs, l'apparition soudaine du LPHS dans certaines localisations géographiques [104] suggère que l'introduction de clones avec une virulence accrue pourrait contribuer à l'émergence récente de ce syndrome [50].

Les autres manifestations hémorragiques observables sont une hématurie, une hématomèse, la présence de méléna, un épistaxis, des pétéchies, des ecchymoses, des saignements au niveau des sites de prélèvement sanguin et un saignement subarachnoïde [103].

Plusieurs facteurs de pronostic de la sévérité de l'atteinte leptospirosique ont été identifiés et sont utilisés comme éléments de pronostic chez des patients hospitalisés. Herrmann-Storck *et al.* [105] ont mis en évidence par analyse multivariée neuf facteurs associés à la sévérité de la leptospirose clinique chez les patients (dans l'ordre des odds ratios décroissants) : des antécédents d'hypertension chronique, une hyperamylasémie, des antécédents d'alcoolisme chronique, des anormalités à l'auscultation pulmonaire, un ictère, une oligurie ou anurie, un début de l'antibiothérapie tardive (> 10 jours après le début des symptômes), un taux d'aspartate amino-transférase élevé, et des troubles de la conscience. A La Réunion, Paganin *et al.* [106] ont montré que les facteurs significativement reliés à la sévérité des signes cliniques chez les patients présentant une atteinte pulmonaire sévère étaient (dans l'ordre des odds ratios décroissants) : la défaillance respiratoire, l'état de choc, une créatininémie supérieure à 200 $\mu\text{mol/l}$ ⁵, et un âge supérieur à 46 ans. Par ailleurs, Marotto *et al.* [107, 108] ont démontré que chez les cas hospitalisés de leptospirose, cinq facteurs permettaient de prédire l'apparition d'un syndrome de détresse respiratoire et étaient liés à la probabilité de décès : une kaliémie élevée (> 4,0 mmol/l), une créatininémie élevée (> 265,2

⁵ Valeurs usuelles de la créatininémie chez l'homme : 80 à 110 $\mu\text{mol/l}$; chez la femme : 60 à 95 $\mu\text{mol/l}$.

μmol/l), une fréquence respiratoire faible, un état de choc à la présentation à l'hôpital, et un score faible sur l'échelle de Glasgow⁶.

1.4. Symptômes oculaires

L'uvéite a été pour la première fois rapportée par Weil en 1886, dans l'article original décrivant la maladie. L'incidence des uvéites dues à la leptospirose est peu connue chez l'homme (3% à 92%) [109], mais cette forme est l'expression clinique la plus fréquente chez les chevaux [110]. L'uvéite due à la leptospirose est commune en zone tropicale. Après 4 à 7 jours de bactériémie, les leptospires sont rapidement éliminés par le système immunitaire de tous les tissus de l'hôte, sauf des localisations privilégiées, telles que le cerveau et les yeux. Il en résulte des désordres immunologiques [111], tels que des uvéites auto-immunes qui se manifestent 2 jours à 4 ans après l'infection systémique. Habituellement, les uvéites commencent dans les 3-6 mois après la maladie clinique initiale [109].

L'uvéite leptospirosique est, en effet, le résultat d'un mécanisme auto-immun. Verma *et al.* [111] ont montré que les lipoprotéines LruA et LruB de *Leptospira* sont exprimées au niveau des yeux des patients (ou chevaux) atteints de leptospirose. Les anticorps dirigés contre LruA réagissent aussi avec la protéine α-crystallin B et la vimentine du cristallin, tandis que les anticorps dirigés contre LruB croisent avec la protéine rétinienne β-crystallin B2.

1.5. Complications

L'origine de la thrombocytopénie observée dans la leptospirose est très controversée. En effet, l'intervention d'un phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est discutée [112], certains auteurs montrent que le phénomène de CIVD n'intervient pas dans l'apparition de la thrombocytopénie et des hémorragies dans le cadre d'une leptospirose [103, 113, 114, 115], alors que d'autres affirment que la CIVD est à l'origine même du syndrome

⁶ L'échelle de Glasgow, ou score de Glasgow (Glasgow coma scale, GCS), est un indicateur de l'état de conscience. Ce score est étroitement corrélé à la gravité des comas. C'est une échelle allant de 3 (coma profond) à 15 (personne parfaitement consciente) et qui s'évalue sur trois critères : ouverture des yeux, réponse verbale, réponse motrice.

hémorragique [101, 116, 117]. Enfin, la thrombocytopénie peut aussi avoir pour origine un phénomène auto-immun avec intervention d'anticorps anti-plaquettaires [118].

La leptospirose est aussi une cause de mortinatalité ou d'avortement chez la femme enceinte [119, 120, 121, 122]. Carles *et al.* [123] rapportent 11 cas de Guyane Française, parmi lesquels 50% de mort fœtales ont été observées. Baytur *et al.* [124] rapportent une grossesse compliquée d'un syndrome de Weil avec accouchement prématuré et mort fœtale (la mère s'est rétablie après un traitement adapté). Shaked *et al.* [125] ont décrit 15 cas de leptospirose chez des femmes enceintes, ayant abouti à huit avortements, deux naissances de bébés sains, et quatre naissances de bébés atteints de leptospirose clinique (dans un cas le statut du fœtus était inconnu). Il semble donc que lorsqu'une leptospirose se déclare dans les premiers mois de grossesse, l'issue la plus probable est l'avortement spontané [125], une forme clinique très répandue chez certains mammifères de rente (porcins, bovins).

Néanmoins, Chedraui et San Miguel [126] décrivent un cas de leptospirose à 28 semaines de grossesse qui a été traité avec succès avec de la pénicilline G permettant la naissance à terme d'un enfant en bonne santé.

Des complications neurologiques sévères telles que le coma, une méningo-encéphalite, une hémiplégie, ou un syndrome de Guillain-Barré ont été décrites même si elles sont très rares [82, 83, 84].

Le **Tableau 4** résume le polymorphisme des manifestations de la leptospirose chez l'Homme :

Tableau 4 : Synthèse des signes cliniques de la leptospirose (d'après [85]).

Hyperthermie non spécifique	Non-ictérique, céphalée, frissons, douleur abdominale, suffusion conjonctivale, myalgies.
Méningite	Liquide cérébro-spinal normal. La maladie peut s'auto-limiter ou progresser vers l'une des formes décrites ci-dessous. Peut être facilement confondue avec la dengue, la fièvre jaune, le paludisme, ou d'autres syndromes fébriles.
Syndrome de Weil	Peut suivre la forme décrite ci-dessus ou apparaître seule. Liquide cérebrospinal avec pléocytose, Bénigne, aseptique, s'auto-limite.
Forme pulmonaire sévère	Ictère flamboyant même si la défaillance hépatique est faible. Insuffisance rénale sévère, souvent manifestations hémorragiques mineures. La dialyse est la thérapie standard de soutien. Forte mortalité (> 10%).
	Pneumonie hémorragique. Peut apparaître en l'absence d'ictère ou comme un élément complétant le syndrome de Weil. Syndrome de détresse respiratoire and hémorragies pulmonaires soudaines et massives induisant une forte mortalité (>50%) même si les traitements optimums sont administrés. Doit être distinguée d'une pneumonie atypique et d'un syndrome pulmonaire lié à une infection par un hantavirus.

1.6. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel varie en fonction de la forme clinique de la maladie. Le syndrome grippal anictérique doit être différencié de la dengue ou d'un accès palustre à *Plasmodium vivax* [127, 128, 129], de la grippe ou d'une infection par le virus du Chikungunya. Pour la forme sévère de leptospirose, le diagnostic différentiel doit être fait avec une hépatite virale, la fièvre jaune, un accès palustre à *Plasmodium falciparum*, la dengue, une infection par les hantavirus [130] ou d'autres fièvres hémorragiques [98], le typhus et autres rickettsioses [94, 128], la typhoïde [129], une endocardite et une maladie auto-immune [73].

La "phase immune" de la leptospirose prend souvent la forme d'un syndrome de méningite aseptique, et doit donc être différenciée des autres causes étiologiques de méningites (virales notamment) [73]. La forme pulmonaire de leptospirose doit être distinguée d'une pneumonie atypique, d'une bronchopneumonie, de la tuberculose [96, 98, 131], de l'histoplasmosis [96], ou d'un syndrome pulmonaire d'infection par un hantavirus [130].

2. Diagnostic biologique

Pendant la phase d'incubation (qui dure 2 à 20 jours [13]), les leptospires peuvent être retrouvés dans le sang et le liquide cérébro-spinal. Les leptospires peuvent être présents dans les urines à partir de 5-7 jours après le début des symptômes. Les IgM apparaissent vers la fin de la première semaine de la maladie, tandis que les IgG apparaissent environ 8-12 jours après le début des symptômes (**Figure 7**).

Observation bactériologique directe : les leptospires peuvent être observés dans le sang, ou le liquide cébrospinal au cours de la première semaine de la maladie, dans les urines à partir du dixième jour de la maladie. L'examen des liquides biologiques peut être effectué directement avec un microscope à fond noir. Pour des examens histologiques, on observe généralement après coloration argentique [132], ou par immunofluorescence [9, 13, 73, 86]. Le diagnostic par observation directe manque de sensibilité et de spécificité [13] et nécessite un observateur entraîné [127, 133].

Culture : Les leptospires peuvent être isolés à partir du sang et parfois du liquide cébrospinal dans la première semaine de la maladie, et à partir des urines lors des deux semaines suivantes ("phase leptospirurique") [73]. Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu EMJH (Ellinghausen - McCullough modifié par Johnson et Harris), qui est commercialisé. La culture doit se faire dans des conditions stériles (prélèvement et ensemencement), elle doit être faite dans les quatre heures suivant le prélèvement et ne peut se faire sur échantillons congelés. Ce test est très peu sensible, lourd à mettre en œuvre et prend plusieurs semaines [73, 87, 127], c'est pourquoi, même s'il reste le "gold standard", il tend à être moins utilisé pour le diagnostic de routine.

Sérologie : Test d'agglutination microscopique (*microscopic agglutination test*, **MAT**). Le MAT (ancienne réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit), est actuellement le test sérologique de référence pour le diagnostic sérologique de la leptospirose [134]. Il s'agit d'un test complexe à mettre en œuvre et à interpréter [13]. Il nécessite l'entretien au laboratoire d'un panel de souches en culture [134]. Le MAT permet de mettre en évidence les anticorps agglutinants (IgM et IgG) dans le sérum d'un patient en mettant en contact différentes dilutions de sérum avec des leptospires vivants. Les anticorps anti-leptospires

présents dans le sérum vont agglutiner les leptospires, cette réaction peut être observée au microscope à fond noir. Le MAT permet le plus souvent de déterminer, avec une certitude raisonnable, le sérotype infectant [13]. Le titre agglutinant d'un sérum est la plus forte dilution de sérum pour laquelle 50% des leptospires sont agglutinés [13]. Les patients produisent généralement des anticorps contre le sérotype infectant, cependant il existe des réactions croisées avec d'autres sérotypes (coagglutinines), en particulier au début de l'infection, qui peuvent parfois être plus fortes que la réaction avec le sérotype infectant (on parle de réaction paradoxale) [13, 135, 136].

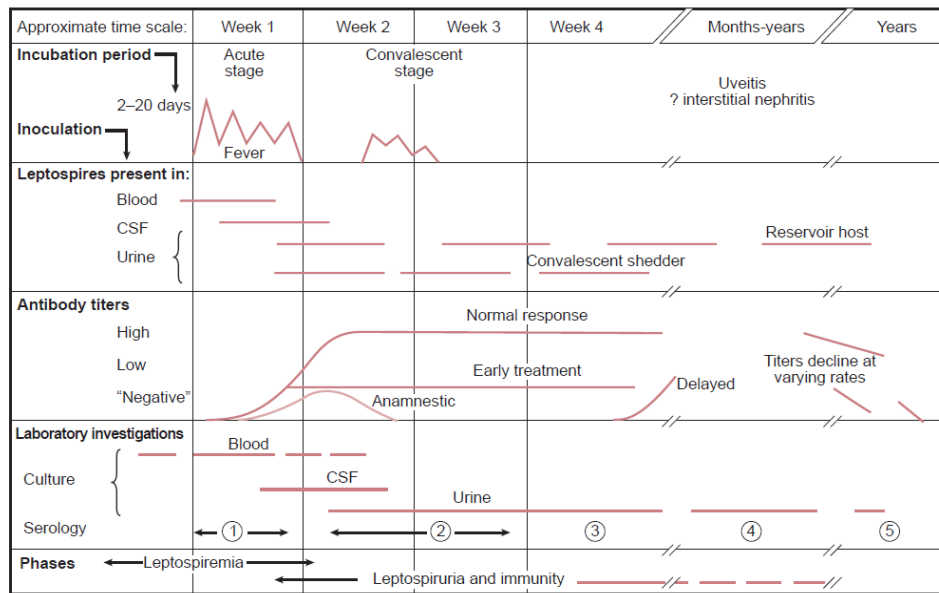
Le MAT permet un diagnostic assez tardif puisque les anticorps n'apparaissent que vers le 7-10^{ème} jour de la maladie [128]. Le seuil de positivité d'infection aiguë chez l'homme, fixé par le Centre National de Référence des Leptospires (Institut Pasteur de Paris), est de 1:100 en France métropolitaine, 1:400 dans les régions ultrapériphériques intertropicales (La Réunion, Mayotte, Nouvelle-Calédonie...) qui sont des zones d'endémie.

Chez les animaux, les seuils de positivité considérés sont très variables en fonction des études, des espèces et de la localisation géographique, allant de 1:10 à 1:1600 [127, 137, 138, 139, 140, 141].

La gamme d'antigènes à tester pour le MAT doit inclure des sérotypes représentatifs de tous les sérotypes, ainsi que des sérotypes circulant localement. Pour un sérum positif, le titre de la réaction d'agglutination envers une souche isolée localement est souvent plus élevé que les titres envers les souches de référence pour les sérotypes du même sérotype. Par ailleurs, il est commun d'inclure une souche non pathogène de *L. biflexa* dans le panel d'antigènes car cette souche présente des agglutinations croisées avec la plupart des souches pathogènes et permet de mettre en évidence des infections par des souches appartenant à des sérotypes non testés [9, 13].

Autres tests sérologiques : il existe de nombreux autres tests sérologiques pour le diagnostic de la leptospirose (test de fixation du complément, test de lyse des érythrocytes sensibilisés, test d'agglutination macroscopique, immunofluorescence, hémagglutination indirecte, dot-ELISA, IgM dipstick, agglutination sur latex...) [13], mais le plus utilisé est le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) IgM. Il existe des kits commercialisés, mais l'ELISA peut aussi être fait avec une mixture d'antigènes "maison". Des antigènes recombinants tels que LipL32 [142, 143, 144], Loa22 [143], OmpL1 [47], LipL41 [47], LipL36 [47] ou Hsp58 (heat shock protein) [47] ont récemment été utilisés.

Amplification génique : la technique de polymérase chain reaction (PCR) est aujourd'hui une technique de routine pour le diagnostic précoce de la maladie. La PCR peut être "conventionnelle", c'est-à-dire suivie d'une migration sur gel d'agarose, ou en temps réel. Différents gènes peuvent être ciblés : *rrs* (ADNr 16S) [145, 146], *IS1533* [147], *lipL32/hap1* [146, 148, 149, 150], *secY* [151], ADNr 23S [152], *lfb1* [153], etc.



CSF: cerebrospinal fluid (liquide céphalo-rachidien)

Figure 7 : Nature biphasique de la leptospirose et investigations cliniques pertinentes aux différents stades de la maladie (d'après [13]).

3. Facteurs de risque de leptospirose

3.1. Facteurs de risque liés au climat

Le caractère saisonnier de la leptospirose a été décrit dans la plupart des régions du monde, avec une incidence significativement plus élevée lors des mois pluvieux, notamment lors de la saison des pluies en zones tropicales [154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161].

Les fortes pluies et les inondations augmentent le risque de leptospirose en amenant les bactéries et leurs hôtes animaux en étroite contact avec les hommes [162]. De nombreux épisodes de leptospirose ont été rapportés dans différentes régions du monde, suite à des périodes de fortes pluies, notamment en Inde [163, 164, 165], au Laos [166], en Indonésie [167], en Italie [168], au Brésil [169], au Nicaragua [93], à Puerto Rico [170], aux Etats-Unis

[171], en Nouvelle-Calédonie [172], en France métropolitaine [173], au Brésil [174], à Trinidad et Tobago [154], en Polynésie française [175], en Guadeloupe [176], en Argentine [177], et à La Réunion [156] par exemple.

Article 1 : Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, Michault, A. 2011. Seasonality of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. PLoS ONE, 6(5): e20377.

Seasonality of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and Its Association with Meteorological Data

Amélie Desvars^{1,2,3*}, Sylvaine Jégo³, Frédéric Chiroleu³, Pascale Bourhy⁴, Eric Cardinale^{1,2}, Alain Michault⁵

1 Unité Mixte de Recherche Contrôlée des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMR CMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte-Clotilde, La Réunion, France, **2** Centre Régional de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes de l'Océan Indien (CRVOI), Sainte-Clotilde, La Réunion, France, **3** UMR Peuplement Végétal et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), CIRAD, Saint-Pierre, La Réunion, France, **4** Institut Pasteur, Centre National de Référence des Leptospiroses, Unité Postulante de Biologie des Spirochètes, Paris, France, **5** Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier de La Réunion (CHR), Saint-Pierre, La Réunion, France

Abstract

Background: Leptospirosis is a disease which occurs worldwide but particularly affects tropical areas. Transmission of the disease is dependent on its excretion by reservoir animals and the presence of moist environment which allows the survival of the bacteria.

Methods and Findings: A retrospective study was undertaken to describe seasonal patterns of human leptospirosis cases reported by the Centre National de Références des Leptospiroses (CNRL, Pasteur Institute, Paris) between 1998 and 2008, to determine if there was an association between the occurrence of diagnosed cases and rainfall, temperature and global solar radiation (GSR). Meteorological data were recorded in the town of Saint-Benoît (Météo France "Beaufonds-Miria" station), located on the windward (East) coast. Time-series analysis was used to identify the variables that best described and predicted the occurrence of cases of leptospirosis on the island. Six hundred and thirteen cases were reported during the 11-year study period, and 359 cases (58.56%) were diagnosed between February and May. A significant correlation was identified between the number of cases in a given month and the associated cumulated rainfall as well as the mean monthly temperature recorded 2 months prior to diagnosis ($r = 0.28$ and $r = 0.23$ respectively). The predictive model includes the number of cases of leptospirosis recorded 1 month prior to diagnosis ($b = 0.193$), the cumulated monthly rainfall recorded 2 months prior to diagnosis ($b = 0.145$), the average monthly temperature recorded 0 month prior to diagnosis ($b = 3.836$), and the average monthly GSR recorded 0 month prior to diagnosis ($b = -1.293$).

Conclusions: Leptospirosis has a seasonal distribution in Reunion Island. Meteorological data can be used to predict the occurrence of the disease and our statistical model can help to implement seasonal prevention measures.

Citation: Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, et al. (2011) Seasonality of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and Its Association with Meteorological Data. PLoS ONE 6(5): e20377. doi:10.1371/journal.pone.0020377

Editor: David M. Ojcius, University of California Merced, United States of America

Received: January 25, 2011; **Accepted:** April 30, 2011; **Published:** May 31, 2011

Copyright: © 2011 Desvars et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amelie.desvars@cirad.fr

Introduction

With more than 500,000 cases per year, leptospirosis is one of the most widespread diseases in the world [1]. *Leptospira* spp. (phylum Spirochaetes) are bacteria composed of both saprophytic and pathogenic members, such as *Leptospira biflexa* sensu lato and *Leptospira interrogans* sensu lato, respectively [2]. Leptospirae are motile, aerobic and slow-growing bacteria that have an optimal growth temperature of 30°C and are able to survive in soil and water for long periods [2]. Although asymptomatic infections are common in humans, the disease can also be lethal [3]. The incidence is significantly higher in tropical countries than in temperate regions, mainly because of the longer survival period of leptospirae in a warm, humid environment [4]. Infection in humans is either via direct contact with the urine of an infected

animal or indirectly via the contaminated environment [4]. The latter is the major source of leptospirosis infections in tropical areas [5]. Rodents are the most efficient epidemiological reservoirs for pathogenic leptospirae [6,7] but dogs are also a significant reservoir responsible for human infection in tropical countries [8,9]. Many sporadic cases of leptospirosis in tropical regions occur following exposure during simple day-to-day activities [10,11]. Many infections result from walking barefoot in damp conditions or gardening with bare hands [12]. Moreover, recent outbreaks such as the 1998 Lake Springfield Triathlon [13] and the 2000 Borneo Eco-Challenge [14] outbreaks revealed the risk of exposure to infection to leisure activities.

As the growth of *Leptospira* is very slow, the culture of blood or urine samples in a specific medium is rarely conducted for clinical diagnosis. The microscopic agglutination test (MAT), is the

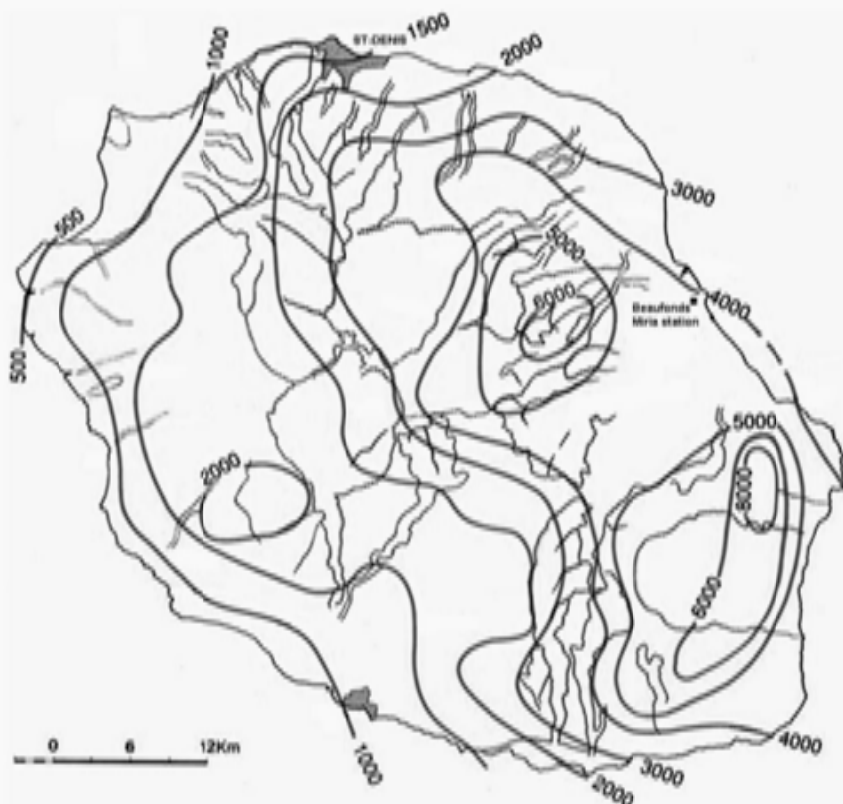


Figure 1. Annual rainfall in Reunion Island (from [21]). Isohyetal lines and location of the Météo France meteorological Beaufonds-Miria station.
doi:10.1371/journal.pone.0020377.g001

serological standard reference test for diagnosing leptospirosis. A positivity threshold of 1/100 is used in metropolitan France but, since 1999, the threshold of 1/400 has been used in high-risk French overseas territories such as Reunion Island [15]. Since 1997, DNA amplification has also been used in Reunion Island as a standard method of diagnosis [16]. Polymerase-chain reaction (PCR) with specific *Leptospira* primers allows the bacteria in patients' serum to be detected from the onset of symptoms to the appearance of antibodies, thus increasing the rate of early diagnosis in the island.

Diagnosis of leptospirosis is a reliable, standard procedure. Nevertheless, there is a need for a leptospirosis early warning system to predict when and where leptospirosis epidemics may occur. Unusual meteorological conditions, such as high rainfall, flooding or El Niño effects are often cited retrospectively as the precipitating factors for epidemics [17,18,19,20] and might be useful in predicting the number of cases of leptospirosis.

In this study, we present leptospirosis cases in Reunion Island from 1998 to 2008. The objectives of this study were to describe seasonal patterns of leptospirosis reported in Reunion Island, and to determine if cases were associated with rainfall, temperature and global solar radiation (GSR). Results are discussed according to geographical, meteorological and socio-economical aspects. Our model showed that data on rainfall, temperatures and GSR could be successfully used to predict the number of cases in a given month. Consequently, if risk periods can be predicted, early steps

can be taken to prevent infections, thus reducing the monthly number of cases.

Materials and Methods

Presentation of Reunion Island

The island is situated in the south-west Indian Ocean at 55°30' East and 21°05' South. It is 800 km East of Madagascar. The island is part of the Mascareignes archipelago and covers 2,510 km² [21]. According to the 2006 census [22], Reunion Island has 781,962 inhabitants, with a population density of 312.3 people per km². The population is concentrated in coastal towns, while the south-eastern area containing the Piton de la Fournaise volcano is sparsely populated [22]. The climate is tropical and temperatures are the highest from January to March, with a cool season between July and September. The eastern coast (or "windward" coast), has rainfall of around 2,000 mm per year, whereas the western coast (or "leeward" coast), has an annual rainfall of less than 2,000 mm (Figure 1) [21].

Data collection

Human cases. Leptospirosis has been a notifiable disease in France since 1986, but data about the disease are centralized and diffused by the Centre National de Références des Leptospiroses (CNRL) of the Pasteur Institute (Paris). The monthly number of cases was found in the annual reports of the CNRL (<http://www.cnrli.fr>).

pasteur.fr/recherche/Leptospira/LeptospiraF.html), which reports cases confirmed by at least one positive biological test (patients with a MAT titer $\geq 1/400$, or with a positive PCR result, or with a positive blood culture). Based on voluntary participation, data from local hospitals are transmitted yearly to the CNRL. At the time of our analysis, serological data for Reunion Island were available for the period 1998–2009.

Climatic data. Meteorological data was obtained from the station of "Beaufonds-Miria" (run by Météo France, 21.0466°S.; 55.7266°E.) in Saint-Benoît, a town located on the eastern coast (altitude 7 m). We chose this station because the eastern coast presents the highest seroprevalence of the disease [23]. We collected the following data: minimum, maximum and average temperature in degrees Celsius; cumulated, average, minimum and maximum rainfall in millimetres and GSR (the incident radiation of short wavelength an horizontal area receives [21]) in Joules per square centimetre.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with the TSA package of the statistical software R (<http://www.stat.uiowa.edu/~kchan/TSA.htm>) [24]. Time-series analysis [25] was used to identify temporal patterns in the series of cases of leptospirosis, and the relationship between rainfall, temperature or GSR, and the diagnosis of leptospirosis in Reunion Island between 1998 and 2008. Time-series analysis is a method that allows inferences to be drawn from data consisting of serial observations which are correlated over time, by incorporating correlated error terms into the model that is used [25]. To stabilize the variance, a log transformation of each observation was made for further analysis. Autocorrelation (ACF) and partial autocorrelation (PACF) functions were calculated to represent seasonal and cyclical trends in time-series of cases of leptospirosis. After removing the seasonality of each series, the stationarity of each one was tested using ACF and PACF, and using the augmented Dickey-Fuller test. An Auto-Regressive Integrated Moving-Average with exogenous variables model, ARIMAX (p, d, q), was fitted to the time-series of cases of leptospirosis, with p the number of autoregressive parameters, d the number of differencing passes, and q the number of moving average parameters. The study

of cross-correlation functions between the time-series of cases of leptospirosis and each meteorological time-series allowed the potential lags to be identified in the different models tested [25]. The best-fitting model was selected based on the goodness-of-fit criterion, Akaike's Information Criterion (AIC), and coefficients were tested using Student's test.

Results

The 11-year data set consists of human cases of leptospirosis reported each month to the CNRL by hospitals in Reunion Island, and meteorological data from a station in Saint-Benoît collected between 1st January 1998 and 31st December 2008.

Meteorological data

Annual and monthly meteorological data for the 11-year study period are summarized in **Tables 1** and **2** respectively. Cumulated rainfall, mean rainfall and maximum rainfall were highly correlated with minimum temperature, mean temperature and maximum temperature, >0.80 and >0.95 respectively (*data not shown*). Consequently, we chose to keep only the cumulated rainfall and mean temperature variables for further analysis.

The minimum monthly cumulated rainfall over the period from 1998 to 2008 was 17.6 mm (September 2001) and the maximum was 1,520.4 mm (February 1998). On average (\pm S.E.), the monthly mean temperature between 1998 and 2008 was $23.16 \pm 0.19^\circ\text{C}$ and the average monthly global radiation was $1,806.11 \pm 30.63 \text{ J/cm}^2$. December, January, February, and March were the wettest and warmest months, while October, August, and June were the driest months over the study period. July and August were the coolest months and the GSR was the highest ($>2000 \text{ J/cm}^2$) from October to January.

Human cases of leptospirosis in Reunion Island between 1998 and 2008

There were 613 cases reported in Reunion Island between 1998 and 2008 (**Table 3**). The year with the highest number of cases was 2004, with 91 reported cases, while 1999 had the lowest number, 25 reported cases. The annual mean number of cases for

Table 1. Summary of the annual meteorological data in Reunion Island.

Year	Cumulated annual rainfall, in mm	Maximum monthly rainfall, in mm (month)	Minimum monthly rainfall, in mm (month)	Average monthly rainfall, in mm	Mean monthly minimum temperature, in $^\circ\text{C}$ (\pm S.E.)	Average annual temperature, in $^\circ\text{C}$ (\pm S.E.)	Mean monthly maximum temperature, in $^\circ\text{C}$ (\pm S.E.)	Mean annual solar global radiation, in Joules/cm ² (\pm S.E.)
1998	3412	1520.4 (Feb)	62.6 (Mar)	11.47 (\pm 5.07)	19.52 (\pm 0.67)	23.02 (\pm 0.64)	27.23 (\pm 0.60)	1811.68 (\pm 128.00)
1999	3039.8	916.6 (Mar)	27 (Oct)	8.41 (\pm 2.36)	18.86 (\pm 0.57)	22.67 (\pm 0.55)	27.07 (\pm 0.53)	1895.97 (\pm 107.77)
2000	2714.8	594 (Feb)	41.4 (Sep)	7.51 (\pm 1.64)	19.1 (\pm 0.63)	23.73 (\pm 0.62)	26.99 (\pm 0.57)	1831.12 (\pm 100.60)
2001	2145	480.6 (Jan)	17.6 (Sep)	6.7 (\pm 1.76)	19.38 (\pm 0.61)	23.07 (\pm 0.62)	27.4 (\pm 0.64)	1830.57 (\pm 87.86)
2002	2780.8	410.6 (Mar)	72.6 (Oct)	8.22 (\pm 1.17)	19.41 (\pm 0.59)	23.05 (\pm 0.61)	27.18 (\pm 0.58)	1808.35 (\pm 106.88)
2003	2752	643.2 (Apr)	59.2 (Oct)	8.71 (\pm 1.77)	19.76 (\pm 0.69)	23.43 (\pm 0.64)	27.95 (\pm 0.62)	1777.88 (\pm 114.39)
2004	4465.2	966.2 (Dec)	86.6 (Oct)	12.4 (\pm 2.29)	19.72 (\pm 0.67)	23.25 (\pm 0.66)	28.01 (\pm 0.66)	1685.18 (\pm 90.20)
2005	3679.2	826.2 (Feb)	76 (Jul)	10.45 (\pm 2.46)	19.58 (\pm 0.72)	23.3 (\pm 0.70)	28.24 (\pm 0.68)	1760.97 (\pm 102.22)
2006	2795.2	629.8 (Feb)	78.4 (Oct)	8.08 (\pm 1.72)	20.05 (\pm 0.61)	23.44 (\pm 0.62)	27.77 (\pm 0.65)	1819.22 (\pm 105.34)
2007	2981.8	782 (Jan)	37.4 (Nov)	8.27 (\pm 2.31)	19.87 (\pm 0.67)	23.44 (\pm 0.64)	28.22 (\pm 0.58)	1788.03 (\pm 99.20)
2008	3434.4	632.2 (Jan)	82.2 (Apr)	9.68 (\pm 1.63)	19.57 (\pm 0.66)	23.38 (\pm 0.66)	28.51 (\pm 0.63)	1858.21 (\pm 101.36)

Presentation of the yearly data on cumulated and maximum rainfall, minimum, maximum, and mean temperature, and mean global solar radiation, from 1 January 1998 to 31 December 2008 (Beaufonds-Miria station, Saint-Benoît). doi:10.1371/journal.pone.0020377.t001

Table 2. Summary of monthly meteorological data.

Month	Mean of monthly cumulated rainfall, in mm (\pm S.E.)	Mean rainfall, in mm (\pm S.E.)	Mean of maximum rainfall, in mm (\pm S.E.)	Mean of minimum temperature, in °C (\pm S.E.)	Average monthly temperature, in °C (\pm S.E.)	Mean of maximum temperature, in °C (\pm S.E.)	Mean of monthly global radiation in Joules/cm ² (\pm S.E.)
January	439.40 (\pm 51.48)	14.66 (\pm 1.60)	120.75 (\pm 22.47)	22.15 (\pm 0.21)	25.79 (\pm 0.15)	30.10 (\pm 0.20)	2091.78 (\pm 61.03)
February	603.04 (\pm 107.37)	23.35 (\pm 4.69)	163.73 (\pm 27.39)	22.49 (\pm 0.22)	25.98 (\pm 0.15)	30.30 (\pm 0.23)	1905.64 (\pm 78.57)
March	366.56 (\pm 71.05)	12.88 (\pm 2.20)	74.33 (\pm 14.66)	21.95 (\pm 0.18)	25.51 (\pm 0.16)	30.00 (\pm 0.24)	1892.59 (\pm 36.62)
April	290.29 (\pm 47.84)	10.48 (\pm 1.82)	86.27 (\pm 19.71)	20.81 (\pm 0.23)	24.52 (\pm 0.16)	29.24 (\pm 0.24)	1711.15 (\pm 48.98)
May	172.55 (\pm 34.00)	6.06 (\pm 1.22)	39.29 (\pm 10.28)	19.36 (\pm 0.26)	22.91 (\pm 0.16)	27.55 (\pm 0.17)	1391.38 (\pm 46.34)
June	153.15 (\pm 27.50)	5.20 (\pm 0.93)	47.05 (\pm 11.90)	17.27 (\pm 0.17)	21.04 (\pm 0.15)	25.90 (\pm 0.19)	1336.56 (\pm 11.34)
July	209.73 (\pm 28.96)	7.05 (\pm 0.92)	58.60 (\pm 9.94)	16.71 (\pm 0.19)	20.25 (\pm 0.12)	24.79 (\pm 0.16)	1346.75 (\pm 27.95)
August	148.15 (\pm 18.95)	4.94 (\pm 0.59)	38.00 (\pm 8.20)	16.85 (\pm 0.15)	20.41 (\pm 0.09)	25.00 (\pm 0.22)	1572.64 (\pm 23.44)
September	164.35 (\pm 29.48)	5.62 (\pm 1.01)	44.80 (\pm 7.06)	17.47 (\pm 0.17)	21.20 (\pm 0.13)	25.77 (\pm 0.21)	1910.19 (\pm 42.99)
October	96.84 (\pm 14.41)	3.20 (\pm 0.45)	27.85 (\pm 4.22)	18.29 (\pm 0.15)	22.04 (\pm 0.14)	26.52 (\pm 0.20)	2114.38 (\pm 43.97)
November	160.07 (\pm 31.24)	5.37 (\pm 1.04)	52.16 (\pm 13.55)	19.71 (\pm 0.16)	23.43 (\pm 0.20)	27.78 (\pm 0.32)	2196.36 (\pm 51.76)
December	305.00 (\pm 73.18)	10.15 (\pm 2.33)	85.55 (\pm 18.27)	21.25 (\pm 0.13)	24.88 (\pm 0.20)	29.32 (\pm 0.28)	2203.86 (\pm 74.20)

Presentation of monthly data on cumulated and mean rainfall, minimum, maximum, and average temperature, and global solar radiation, 1 January 1998 to 31 December 2008 (Beaufonds-Miria station, Saint-Benoît). doi:10.1371/journal.pone.0020377.t002

this 11-year period was 55.73 ± 6.61 , and 359 cases (58.56%) were diagnosed between February and May (**Figure 2**). On average, the number of cases per month between 1998 and 2008 was 4.64 ± 0.83 . This number varied greatly over the period studied, from 0 to 27. The annual incidence of leptospirosis in Reunion Island ranged from 4.85 to 11.95 cases per 100,000 people between 1998 and 2008 (**Table 3**). The highest incidence was observed between 2003 and 2005, and then decreased by more than 50% to the end of the period.

The time-series of cases and the corresponding cumulated monthly rainfall are shown in **Figure 3**, while **Figures S1** and **S2** represent the time-series of cases and the corresponding average monthly temperature and GSR respectively.

Plots of ACF and PACF indicated a seasonal (annual) and cyclical pattern of diagnosis of cases of leptospirosis with an autoregressive order of less than 12 months. The time-series of cases appeared stationary after elimination of the calendar effects and removing of the seasonality (p -values of the augmented Dickey-Fuller tests were <0.05 for all corrected series).

Significant positive cross-correlations were detected between monthly cases of leptospirosis and monthly cumulated rainfall lagged by 0 and 2 months, and the strongest correlation ($r = 0.28$, $p < 0.01$) was found with the average monthly rainfall recorded 2 months previously (**Table 4**).

Significant positive cross-correlations were detected between monthly cases of leptospirosis and average monthly temperature lagged by 0 and 2 months, and the strongest correlation ($r = 0.23$, $p < 0.01$) was found with the average temperature recorded 2 months previously (**Table 4**).

Significant positive cross-correlations were detected between monthly cases of leptospirosis and monthly minimum temperature recorded 0, 1, 2, 3, and 4 months previously, while significant positive cross-correlations were detected between cases of leptospirosis and monthly maximum temperature recorded 0, 1, and 2 months previously (**Table 4**). Significant negative cross-correlations were detected between the number of cases of leptospirosis and average monthly GSR measured 9 and 10 months previously (**Table 4**). Nevertheless, correlations between GSR and the number

of cases with a lag of 9 and 10 months are not biologically relevant, and consequently were not considered in the model. However, GSR measured 0 months prior to diagnosis was tested in the model to determine its relevance in the predictive model.

The best fitting ARIMAX model of cases of leptospirosis ($p = 1$, $d = 0$, $q = 0$; AIC = 208.29, estimated variance = 0.26, d.f. = 129) included the cases diagnosed in the previous month. Both the cumulated monthly rainfall and average monthly temperature recorded 0, 1, 2, and 3 months prior to diagnosis, as well as the average monthly GSR recorded 0 month prior to diagnosis were associated the model. Only the cumulated rainfall at a 2 months lag and the average temperature and GSR both at a 0 month lag were used in the model (**Table 5**). ACF and PACF of the residuals of the model appeared stationary (*not shown*) and the augmented Dickey-Fuller test confirmed the stationarity ($p = 0.02$). Between 1998 and 2008, the correlation coefficient of our predictive model with the observed data is 0.677 ($p < 10^{-4}$) (**Figure 4**). With meteorological data from 2009, the ARIMAX model could make a prevision of the monthly number of leptospirosis cases with 95% confidence interval (**Figure 4**, **Table 6**).

Discussion

As in many developed countries, the incidence of leptospirosis in Reunion Island is decreasing: this is probably correlated to individual and collective prevention measures, a general increase in hygiene standards and the development of the tertiary sector. In contrast, recreational leptospirosis will probably become more common as water sports and nature activities increase in popularity. Efforts should be made to inform tourists about the disease. Rural leptospirosis may be an intractable problem given the complex ecological interactions involving domestic and wild reservoirs and environmental transmission sources. Results of the present study demonstrate that a combination of three meteorological parameters (rainfall, average temperature and GSR) could affect the number of human cases of leptospirosis. Our findings are largely consistent with hypotheses about the interactions of climatic factors in determining the strength and lag of weather effects on the incidence of leptospirosis. Certainly, our study shows

Table 3. Annual and monthly cases of leptospirosis in Reunion Island.

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total	Mean of the monthly number of cases (\pm S.E.)
January	8	2	1	5	1	3	9	6	2	4	2	43	3.91 (\pm 0.84)
February	11	3	6	4	6	4	18	3	2	5	1	63	5.73 (\pm 1.47)
March	8	5	9	5	5	9	20	27	6	6	5	105	9.55 (\pm 2.18)
April	3	5	6	9	7	18	14	20	12	8	4	106	9.64 (\pm 1.70)
May	2	2	7	6	7	19	10	6	12	4	10	85	7.73 (\pm 1.48)
June	9	4	2	2	3	8	4	8	5	4	3	52	4.73 (\pm 0.75)
July	1	1	4	0	6	6	4	4	3	3	1	33	3.00 (\pm 0.62)
August	2	0	1	2	4	8	2	4	4	0	3	30	2.73 (\pm 0.59)
September	5	3	0	2	2	5	5	3	3	2	3	33	3.00 (\pm 0.47)
October	2	0	0	2	5	3	0	0	3	3	0	18	1.64 (\pm 0.53)
November	0	0	2	2	2	0	4	3	2	2	4	21	1.91 (\pm 0.44)
December	1	0	3	4	3	1	1	2	5	2	2	24	2.18 (\pm 0.44)
Total number of cases	52	25	41	43	51	84	91	86	99	43	38	613	55.78 (\pm 6.61)
Mean of the monthly number of cases (\pm S.E.)	4.33 (\pm 1.08)	2.08 (\pm 0.56)	3.42 (\pm 0.86)	3.58 (\pm 0.70)	4.25 (\pm 0.59)	7.0 (\pm 1.75)	7.58 (\pm 1.92)	7.17 (\pm 2.52)	4.92 (\pm 1.03)	3.58 (\pm 0.67)	3.17 (\pm 0.75)	/	/
Incidence (cases/100,000 inhab./year)	7.51	3.55	5.72	5.90	6.89	11.19	11.95	11.12	7.55	5.44	4.85		

In bold: monthly cases ≥ 10 .

Presentation of the total number of cases of leptospirosis per month and per year in Reunion Island, mean monthly cases, and annual incidence (1 January 1998 to 31 December 2008). doi:10.1371/journal.pone.0020377.t003

Seasonality of Leptospirosis

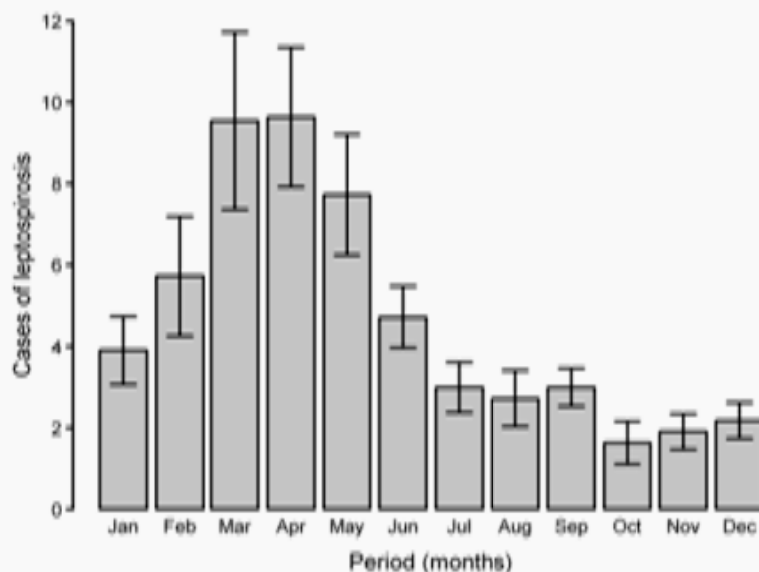


Figure 2. Monthly data on leptospirosis in Reunion Island. Mean number and standard error of monthly cases of leptospirosis in Reunion Island, 1 January 1998 to 31 December 2008. doi:10.1371/journal.pone.0020377.g002

that there is a link between monthly cases of leptospirosis in Reunion Island and both the cumulated rainfall recorded 2 months previously and average temperature and GSR, both recorded during the month considered. These three variables can

be incorporated in a predictive model which can warn of future outbreaks of human leptospirosis in Reunion Island.

Only diagnosed forms (most of the time with hospitalization of the patient) are voluntarily reported to the CNRL (patients with a

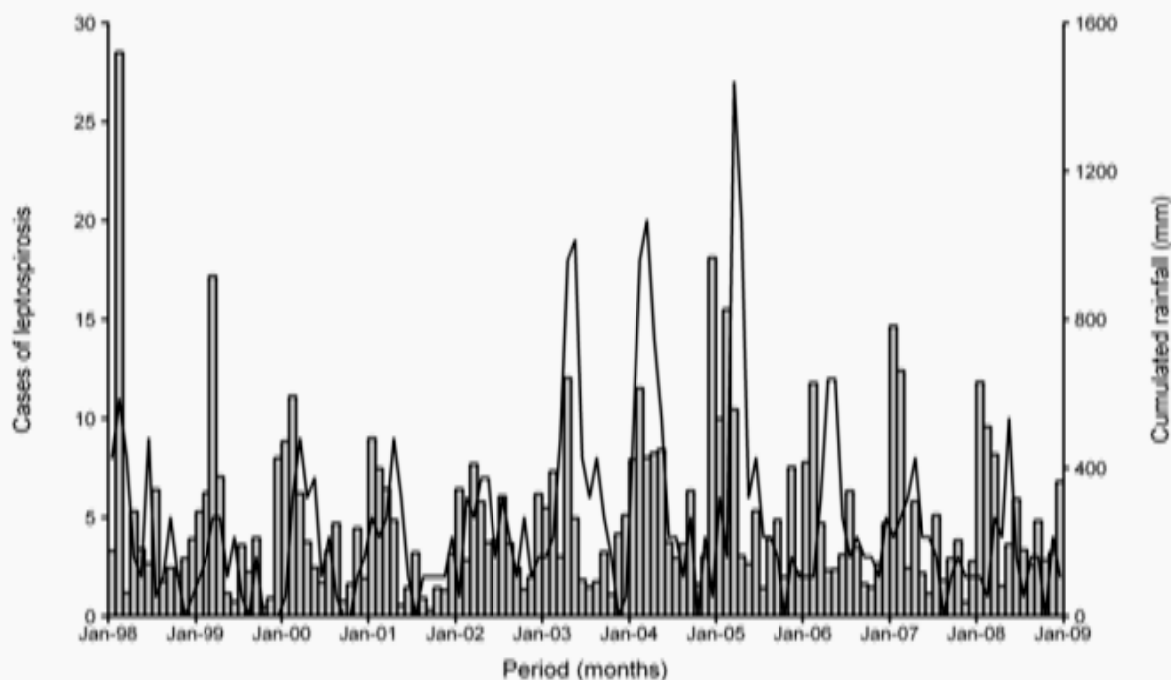


Figure 3. Leptospirosis and rainfall in Reunion Island. Monthly cases of leptospirosis (continuous line) and cumulated rainfall (bar chart), Beaufonds-Miria station, Saint-Benoit, 1 January 1998 to 31 December 2008. doi:10.1371/journal.pone.0020377.g003

Table 4. Cross-correlation between cases of leptospirosis and five meteorological parameters in Reunion Island.

Lag (months)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cumulated rainfall													
Correlation	0.2019*	0.1525	0.2823*	0.1637	0.1076	0.0073	-0.0219	-0.1075	-0.0992	-0.1181	0.0499	0.1305	0.0954
P-value	0.0202	0.0621	0.0011	0.0638	0.2365	0.9351	0.4078	0.2329	0.2732	0.1487	0.5852	0.1538	0.2968
Mean average temperature													
Correlation	0.1881*	0.1668	0.2267*	0.1540	0.1661	0.0547	-0.0394	-0.0727	-0.1510	-0.1617	-0.0798	-0.0119	0.1187
P-value	0.0308	0.0569	0.0095	0.0815	0.0609	0.5475	0.6613	0.4201	0.2942	0.0740	0.3825	0.8336	0.1927
Mean minimum temperature													
Correlation	0.2113*	0.1885	0.2623*	0.1886	0.1913	0.0700	-0.0382	-0.0832	-0.1443	-0.1749	-0.0847	-0.0119	0.1166
P-value	0.0192	0.0329	0.0025	0.0123	0.0305	0.4543	0.6630	0.3565	0.1100	0.0511	0.3536	0.8972	0.2049
Mean maximum temperature													
Correlation	0.1911*	0.1680	0.2080*	0.1326	0.1277	0.1182	-0.0428	-0.0499	-0.1424	-0.1355	-0.0616	-0.0101	0.1385
P-value	0.0285	0.0551	0.0175	0.1343	0.1509	0.8383	0.6361	0.5804	0.1148	0.1350	0.5805	0.9126	0.1553
Mean global solar radiation													
Correlation	-0.0569	-0.0429	0.0622	0.0593	0.0916	0.1032	0.0163	-0.0016	-0.1532	-0.2234*	-0.2153*	-0.1704	0.0087
P-value	0.5767	0.4265	0.3523	0.5041	0.3040	0.2482	0.8560	0.9853	0.2893	0.0130	0.0172	0.0676	0.9158

*Maximum of correlation between the monthly number of cases of leptospirosis and the meteorological factor considered.
 Cross-correlation between 613 cases of leptospirosis reported in Reunion Island from 1 January 1998 to 31 December 2008, and cumulated monthly rainfall, mean monthly average temperature, mean monthly minimum temperature, mean monthly maximum temperature, and mean monthly solar global radiation, recorded in Saint-Benoit, lagged by 0–12 months.
 doi:10.1371/journal.pone.0020377.t004

MAT titer $\geq 1/400$, or with a positive PCR result, or with a positive blood culture). Consequently, the number of reported cases is significantly lower than the number of present cases of leptospirosis in Reunion Island [23]. A small number of cases could also be the result of poor epidemiological surveillance of the disease, leading to a decrease in the number of reported cases, and thus impacting on the validity of the data.

There are no comparable studies on Reunion Island providing an analysis over such a long time period as presented in this paper. Cases of leptospirosis were reported all year round, but epidemics showed seasonality since they mainly occurred during the rainy season, between February and May. Our results confirmed prior observations showing that the prevalence of the disease in Reunion Island is affected by rainfall [23,26]. Therefore, despite the popular belief, the peak incidence of leptospirosis in Reunion Island was not during the sugar cane harvest (July to December) and other factors of contamination should be proposed. The prevalence on the west coast (annual rainfall inferior to 2,000 mm) was 0.712%. In areas with intermediate annual rainfall (2,000 to 4,000 mm), the prevalence was 1.444%, and in south-eastern areas (total annual rainfall superior to 4,000 mm), the prevalence was 3.093% [23]. Leptospirosis seasonality is also observed in French Polynesia where the monthly number of leptospirosis cases decreases during the dry season (July to October) [27] as well as in Martinique, where more than 35% of the annual cases occur during the rainy season (September to November).

The link between leptospirosis and rainfall is supported by previous observations made in Martinique, where a correlation was established between the occurrence of the disease and rainfall in the previous month [28] and in Guadeloupe, where the cycle of transmission begins about one month after the onset of heavy rain [29]. In Rio de Janeiro (Brazil), cluster case events between 1997 and 2002 were associated with heavy rainfall (OR 3.71; 95% CI 1.83–7.51) occurring 3–20 days before the onset of illness [30]. In Trinidad and Tobago, Mohan *et al.* [31] showed also a lag of 1–2 months between the onset of the rainy season (heavy rainfall) and the peak number of cases, and found a weak positive association between number of cases and amount of rainfall recorded each month ($r = 0.56$). The lag period of 1–2 months between heavy rainfall and cases is consistent with the probable effect of flooded land and water-soaked soils on leptospiral organism survival (1 to 2 months) and an average incubation period for leptospirosis of 1 to 3 weeks. In many parts of the world heavy rainfall and flooding can lead to outbreaks of leptospirosis, especially in tropical countries [19,20] since transmission is often indirect in these areas.

During the rainy season the soil remains moist and can lead to the formation of pools of water which helps leptospires surviving for a longer period of time, and ultimately can lead to an increase in human and animal exposure to the bacteria. The model of Barcellos and Sabroza [32] shows that during dry periods, high leptospira concentrations in the soil are limited to a few metres around waste accumulation sources. During floods, the infectious bacteria can reach distant areas under the impact of water which increases the possibility of contact with all the population. In Reunion Island, as well as in many tropical countries, the frequency of flooding episodes may increase in the future due to changes in demographic patterns, destruction of ecologically sensitive areas such as wet lands, deforestation, reduction of the rural areas and climate change. Therefore the incidence of leptospirosis might increase in the future without the implementation of appropriate prevention strategies.

In our model, temperature was positively correlated with the case incidence at a lag of 0 months ($b = 3.836$). Variations of

Table 5. Best-fitting regression model of cases of leptospirosis in Reunion Island.

Variable	Lag (months)	<i>b</i>	S.E.	95% C.I.	Student's <i>t</i> test	<i>p</i> -value
Constant	-	3.397	2.984	[-2.452-9.246]	1.138	0.255
Cases of leptospirosis	1	0.193	0.088	[0.02-0.366]	2.189	0.0286
Cumulated rainfall	0	-0.007	0.079	[-0.162-0.148]	0.084	0.9327
Cumulated rainfall	1	0.027	0.069	[-0.108-0.163]	0.397	0.6913
Cumulated rainfall	2	0.145	0.069	[0.011-0.28]	2.116	0.0343
Cumulated rainfall	3	0.056	0.069	[-0.079-0.192]	0.813	0.4161
Average temperature	0	3.836	1.445	[1.004-6.668]	2.655	0.0079
Average temperature	1	-0.469	0.606	[-1.658-0.719]	0.774	0.4388
Average temperature	2	-0.482	0.625	[-1.706-0.742]	0.772	0.4401
Average temperature	3	-0.82	0.655	[-2.103-0.464]	1.252	0.2107
Average global solar radiation	0	-1.293	0.494	[-2.26--0.325]	2.618	0.0088

b: coefficient value; S.E.: standard error; 95% C.I.: 95% confidence interval.

Parameters included in the best-fitting regression model of cases of leptospirosis (reported by the CNRL) in Reunion Island, 1 January 1998 to 31 December 2008

(AIC = 208.29, variance = 0.26, d.f. = 129).

doi:10.1371/journal.pone.0020377.t005

temperature are seasonal in Reunion Island, with high temperatures occurring during the rainy season and medium to cold temperatures occurring during the austral winter. Surface water temperatures follow the evolution of the air temperature, and in Reunion Island are highly dependent on geographical location and altitude. Thus survival of leptospires in water and soil may depend on the month, the nature of the water and location (east vs west, coast vs mountain).

Moreover, our results showed a negative correlation between the monthly cases and GSR recorded during the same month ($b = -1.293$). GSR is directly linked to the amount of UV radiation received at ground level and it is already known that UV exposure of more than two hours is lethal for leptospires [2]. GSR thus has an effect on the number of leptospirosis cases reported. Consequently, the dry season is clearly not favourable for

leptospirosis transmission, since due to the low level of rainfall and high GSR (Figures 3 and S2).

Our model, based on three meteorological parameters, estimates 67.7% of the variation of the monthly number of leptospirosis cases. Nevertheless, the peak incidence observed in February 2009 (13 cases) was not predicted by our model (number of cases predicted = 4), but the model gave a good prediction of the number of cases observed in March and April 2009 (observations were 9 and 10 cases respectively, while predictions were 8 and 11 respectively) (Table 6). Moreover, our model was not able to explain the major variations in the incidence of the disease observed in April and May 2003 (18 and 19 observed cases versus 10 and 13 predicted), March 2004 (20 observed cases versus 8 predicted), and March 2005 (27 observed cases versus 10 predicted). Thus, factors other than climatic must be taken into

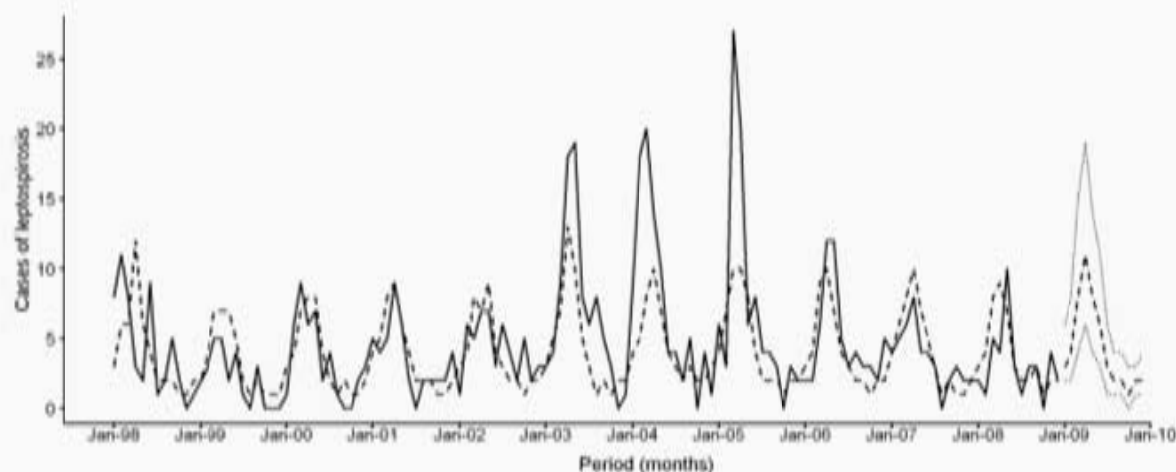


Figure 4. Observation and prediction of the monthly number of cases of leptospirosis in Reunion Island. Monthly number of cases reported by the CNRL from 1 January 1998 to 31 December 2008 (continuous line), number of cases predicted by the model from 1 January 1998 to 31 December 2009 (dotted line), and 95% confidence interval of the prediction for 2009 (dot-dashed line).

doi:10.1371/journal.pone.0020377.g004

Table 6. Predicted cases of leptospirosis in 2009, by month.

	Observed data	Prediction	95% C.I.
January 2009	5	3	2–6
February 2009	13	4	2–8
March 2009	9	8	4–15
April 2009	10	11	6–19
May 2009	6	8	4–14
June 2009	5	6	3–11
July 2009	4	3	1–6
August 2009	3	2	1–4
September 2009	5	2	1–4
October 2009	2	1	0–3
November 2009	3	2	1–3
December 2009	6	2	1–4
Total number of cases	71	52	

Presentation of the values predicted by the model for 2009 and 95% confidence interval (95% C.I.), compared to the data reported by the CNRL (the “observed data”) for the same year.
doi:10.1371/journal.pone.0020377.t006

account to explain the highest monthly incidences of leptospirosis in Reunion Island.

In addition, the correlation between leptospirosis cases and the three meteorological parameters is weak ($b = 0.145$, $b = 3.836$, $b = -1.293$, for cumulated rainfall, mean temperature and solar global radiation respectively). In consequence, we can suppose that the model is not powerful enough to explain all the fluctuations in monthly cases, in particular when the number of cases is abnormally high. Our model can show the tendency of the incidence variations and, if it is undoubtedly a good predictor of monthly cases, it can not predict extreme values. Other parameters may greatly influence the survival of leptospires in the environment such as concentrations of oxygen and iron in water [2] or soil and water pH [33].

We did not include tropical cyclone data in our model because the difference between a depression, a tropical storm and a cyclone is mainly based on the wind speed which has a smaller impact than rainfall on the epidemiology of leptospirosis. Indeed, after cyclones, outbreaks of leptospirosis are mainly linked with flooding [34,35].

Knowledge of the association between leptospirosis and three meteorological factors allows people to be alerted, particularly before

the rainy season, of the risks present in the environment. This measure should achieve a reduction in exposure to leptospires during the high-risk period. Furthermore, as vaccinal immunity only lasts few months, our study shows that a seasonal vaccination based on the analysis of climatic data could be carried out on domestic animals. Individual measures of protection must be recommended particularly during the high-risk period, such as wearing gloves and boots when gardening, disinfecting the wound immediately in the case of a skin injury or avoiding drinking and submersion in flood or freshwater. Several serogroups are circulating in Reunion Island but the one mostly found in human cases is *Icterohaemorrhagiae* [23] followed by *Canicola* [23,36]. Thus, rats and dogs are suspected to be the main carriers of leptospires on the island. They transmit the bacteria via infected urine, and the rainy season greatly favours the survival of the bacteria in the environment. Therefore, active rat control measures should be undertaken before and during the rainy season as well as the control of the stray dog populations and the cleaning of illegal dump sites.

Supporting Information

Figure S1 Leptospirosis and temperature in Reunion Island. Monthly cases of leptospirosis (black curve) and average temperature (dotted curve), Beaufonds-Miria station, Saint-Benoit, 1 January 1998 to 31 December 2008.
(TIFF)

Figure S2 Leptospirosis and global solar radiation in Reunion Island. Monthly cases of leptospirosis (black curve) and global solar radiation (dotted curve), Beaufonds-Miria station, Saint-Benoit, 1 January 1998 to 31 December 2008.
(TIFF)

Acknowledgments

We are very grateful to Guy Baranton for his help with the research of historic data on leptospirosis diagnosis in Reunion Island, Vincent Michault, Andrew Hobson, and Guy Lemprière for comments on the manuscript, and Renaud Lancelot for his advices in statistics.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AD. Performed the experiments: AD SJ. Analyzed the data: SJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: FC PB. Wrote the paper: AD SJ AM. Provided data: AM PB. Helped in the epidemiological interpretation of data: AM EC. Helped with the statistical analysis: FC.

References

- World Health Organization (1999) Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec* 74: 267–242.
- Faine S, Adler B, Bolin G, Perolat P (1999) *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia: MedSci, 290 p.
- Katz AR, Ansell VE, Eiler PV, Mahdlein CR, Sasaki DM (2001) Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974–1996. *Clin Infect Dis* 33: 1834–1841.
- Levent PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Monahan AM, Miller DS, Nally JE (2009) Leptospirosis risks during recreational activities. *J Appl Microbiol* 107: 707–716.
- Priva CG, Hongraddik KT, Berg MDV, Rathinam SR, Ahmed A, et al. (2007) Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. *J Postgrad Med* 53: 236–240.
- Tecunhuva de Faria M, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Harskeel RA, et al. (2005) Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 108: 1–5.
- Bred CS, Aleixo JAG, Jouglaud SDD, Fernandes GPH, Teixeira JLR, et al. (2005) Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 294–300.
- Weekes CC, Everard COR, Levent PN (1997) Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Vet Microbiol* 57: 215–222.
- Everard CO, Bennett S, Edwards GN, Nicholson GD, Hassel TA, et al. (1992) An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. *J Trop Med Hyg* 95: 13–32.
- Perrocheau A, Perolat P (1997) Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *Eur J Epidemiol* 13: 161–167.
- Douglas CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levent PN (1997) Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis* 3: 78–80.
- Morgan J, Bornstein Shari L, Karpati Adam M, Bruce M, Bolin CA, et al. (2002) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 34: 1593–1599.
- Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bentinger J, Bajani M, et al. (2003) Leptospirosis in “recreational” athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 9: 702–707.

15. Picardeau M, Cornet M, Morel V, Serruier N, Chaumet D, et al. (2006) Impact of the revised diagnostic policy on the diagnosis and surveillance of leptospirosis in France [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 37: 329–331.
16. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Athaud A, et al. (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139–147.
17. Hermann-Storck C, Postic D, Lamaury I, Perez JM (2006) Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Niño southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect* 136: 1407–1415.
18. Sanders EJ, Rigau-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, et al. (1999) Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am J Trop Med Hyg* 61: 399–404.
19. Gaynor K, Katz AR, Park SY, Nakata M, Clark TA, et al. (2007) Leptospirosis on Oahu: an outbreak associated with flooding of a university campus. *Am J Trop Med Hyg* 76: 882–886.
20. Pappachan MJ, Sheela M, Aravindan KP (2004) Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. *J Epidemiol Community Health* 58: 1054–1055.
21. Raoult M (1991) Physical environment and soils of Reunion. Consequences for effective agricultural and use [in French]. CIRAD-IRAT, editor. Montpellier, France: CIRADParis, 438 p.
22. INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques) (2010) *Tableau Economique de La Réunion (TER)* Edition 2010. Paris, France, 237 p.
23. Duval G, Michault A, Baranton G, Lau-Koune JD, Fido G, et al. (1991) Sero epidemiological survey on human leptospirosis in Reunion Island [in French]. *Rev Epidemiol Santé Publique* 39: 135–141.
24. Cryer JD, Kung-Sik C (2006) Time series analysis: With applications in R. Second edition. Casella G, Fienberg S, Olkin I, eds. New York, USA: Springer, 491 p.
25. Shumway RH, Stoffer DS (2006) Time series analysis and its applications: With R examples (Springer texts in statistics). Englewood Cliffs New Jersey: Springer, 575 p.
26. Mailloux M, Debarbat F, Mollaret HH (1983) Leptospirosis in the island of Reunion. I. Human leptospirosis [in French]. *Bull Soc Pathol Exot* 76: 729–735.
27. Hirschauer C, Daudens E, Coudert C, Frogier E, Melix G, et al. (2009) Epidemiology of leptospirosis in French Polynesia from 2006 to 2008 [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 48-49-50: 508–511.
28. Lhomme V, Grolier-Bois L, Josuannelle J, Elisabeth L (1996) Leptospirosis in Martinique from 1987 to 1992: results of an epidemiological, clinical and biological study. *Med Mal Infect* 26: 94–98.
29. Hermann-Storck C, Brioudes A, Quirin R, Deloumeaux J, Lamaury I, et al. (2005) Retrospective review of leptospirosis in Guadeloupe, French West Indies 1994–2001. *West Indian Med J* 54: 42–46.
30. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, et al. (2008) Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int Health* 13: 503–512.
31. Mohan ARM, Cumberbatch A, Adeshun AA, Chadee DD (2009) Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996–2007: A retrospective study. *Acta Trop* 112: 260–265.
32. Barcellos C, Sabroza PC (2001) The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica* 17(supplemento).
33. Gordon Smith CE, Turner LH (1961) The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bull OMS* 24: 35–43.
34. Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P (2002) Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. *Natl Med J India* 15: 22–23.
35. McCurry J (2009) Philippines struggles to recover from typhoons. *Lancet* 374: 1409.
36. Agésilas F, Grey F, Monbrun A, Combes JC, Llanas B, et al. (2005) Acute leptospirosis in children in Reunion Island: a retrospective review of 16 cases [in French]. *Arch Pediatr* 12: 1344–1348.

En Argentine, les inondations apparaissent comme le facteur de risque majeur de leptospirose, devant l'activité professionnelle. A Bombay, en Inde, une augmentation d'un facteur huit du nombre de cas a été rapporté après une forte inondation en 2005 [164]. A Manille, aux Philippines, une épidémie importante de leptospirose a été observée après une tempête tropicale et des inondations en octobre 2009, avec un taux de mortalité s'élevant à 8,6% [178].

Les inondations provoquent un lessivage des sols contaminés vers les sources d'eau plus vastes, utilisées par les hommes et/ou les animaux, ce qui augmente le risque d'interactions entre la bactérie et les hôtes potentiels.

Néanmoins, les données épidémiologiques suggèrent que le modèle de transmission liée à l'eau est incomplet : 1/ de nombreux cas de leptospirose apparaissent quelques mois après le début des fortes pluies [179]; 2/ les cas de leptospirose ne sont pas toujours groupés les mois ou les années au cours desquels la pluviométrie est supérieure à la moyenne [158, 179]; 3/ on note l'absence de cas de leptospirose après de fortes pluies ou des inondations dans des endroits où la maladie est endémique [158]; 4/ lorsqu'on établit un modèle statistique des cas en fonction des données météorologiques, celles-ci ne suffisent pas à expliquer toutes les variations du nombre de cas (notamment le modèle ne permet pas de prédire les nombres extrêmes) [156]. Ces observations suggèrent que la capacité des leptospires pathogènes à survivre dans un environnement aqueux est un facteur important dans la transmission d'un hôte à un autre [180].

3.2. Facteurs de risque socio-économiques

Les facteurs de risque de contamination par *Leptospira* sont nombreux, souvent dépendants de facteurs environnementaux, mais les facteurs socio-économiques ne sont cependant pas à négliger.

Certaines études montrent que les zones rurales sont plus touchées par la maladie que les zones urbaines [177, 181, 182], mais cela n'est pas vérifié partout. Dans les zones urbaines défavorisées, telles que les bidonvilles [183], ou dans les populations résidant à proximité d'une décharge à ciel ouvert [91, 183, 184, 185] l'incidence de la maladie est plus importante que dans les zones socialement plus riches [3, 136]. Une étude dans un bidonville à Salvador, au Brésil, a montré qu'avoir un salaire bas et être de race noire étaient des facteurs de risque

d'infection par *Leptospira* et qu'une augmentation du revenu de 1\$US par habitant et par jour était associé à une diminution de 11% (IC 95% [5%-18%]) du risque d'infection [184].

Marcher pieds-nus, habitude très fréquente dans les régions pauvres, mais aussi dans les zones tropicales plus développées comme La Réunion ou Mayotte, est un facteur de risque de contamination [185].

Il est communément admis que les agriculteurs sont les personnes les plus exposées à la leptospirose. Les égoutiers, les forestiers, les personnes en contact avec les animaux (dresseurs, personnels d'abattoirs, bouchers, fermiers, vétérinaires...), ainsi que les mineurs sont aussi des professionnels très exposés [186, 187, 188, 189]. Tous les métiers nécessitant un contact prolongé avec de l'eau sont des professions à risque [190].

Les personnes travaillant dans les rizières sont extrêmement exposées à la maladie, en effet, les rizières sont des zones très humides, l'utilisation de bœufs ou de buffles aux champs, et la présence de rongeurs, notamment en saison de récolte, lorsque le riz est mûre, favorise la survie et permet la transmission des leptospires dans ces zones [186]. Une étude rapporte que, dans le sud de l'Inde, 68,3% (225/329) des personnes travaillant en rizière ont des anticorps dirigés contre *Leptospira* [190]. Aux îles Andaman, en Inde, la séroprévalence de la leptospirose dans la population considérée comme "à risque" est de 52,7% [186]. Des études conduites sur les populations très exposées au Chili, à Trinidad et à la Barbade ont montré des séroprévalences de 22%, 49%, et 39% respectivement [191, 192].

3.3. Autres facteurs de risque

3.3.1. Le sexe et l'âge du patient

Dans le monde, la maladie clinique est généralement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes [90, 154, 166, 168, 176, 177, 193, 194, 195, 196, 197, 198]. Cependant, à Salvador, au Brésil, Dias *et al.* [181] ont montré que la séroprévalence de la leptospirose n'était pas différente chez les hommes et chez les femmes, observation également faite dans d'autres études, au Bangladesh [199] et à Rio de Janeiro (Brésil) [200].

En fonction de la zone géographique, la catégorie d'âge la plus exposée peut varier. En effet, la maladie est plus fréquente chez les 20-29 ans à Hawaï [193], chez les 20-29 et les > 50 ans en Nouvelle-Calédonie [194], chez les plus de 30 ans en Argentine [177], chez les

30-59 ans en Croatie [195], en Polynésie française, 50% des cas sont âgés de 10 à 29 ans [196], en Australie, dans le Queensland, la catégorie d'âge la plus atteinte est 21-40 ans [197], ce sont les 25-54 ans au Portugal [198], les hommes de 26-35 ans à La Réunion [201], etc. Ces exemples montrent qu'en fonction du pays, des activités et des habitudes quotidiennes, la catégorie d'âge la plus touchée dans une population est variable.

Généralement, au niveau mondial, on relève trois caractéristiques majeures: d'abord, c'est une maladie qui touche significativement plus les hommes que les femmes, ensuite, chez les personnes ayant une activité professionnelle, la séroprévalence de cette maladie augmente avec l'âge [90, 181, 194, 200], enfin, la leptospirose est peu diagnostiquée chez les enfants [91, 168, 193].

3.3.2. L'exposition par les loisirs

Des activités courantes et simples, telles que le jardinage ou la pêche en eau douce sont des activités qui exposent les pratiquants aux leptospires [179, 202]. Avec l'amélioration des conditions d'hygiène, des équipements de protection, et la fermeture en masse des mines dans l'ouest du pays, la part des leptospiroses due à l'exposition professionnelle diminue en Italie, alors que celle associée aux activités de loisir est en augmentation [168].

L'exposition à la leptospirose par les loisirs est relativement récente. Le développement du tourisme, des activités nautiques et autres sports pratiqués dans des zones humides, en zones tempérées [203, 204, 205] et tropicales [206, 207, 208], a permis l'apparition de nombreux cas liés à ces activités de détente ou de loisirs. Suite à l'Eco-Challenge-Sabah, une course d'endurance multisports, qui a eu lieu du 21 août au 1^{er} septembre 2000 à Bornéo en Malaisie, une vingtaine de cas de leptospirose ont été identifiés [208, 209]. Une épidémie a aussi été rapportée suite à un triathlon à Springfield, dans l'Illinois, en 1998, avec trois athlètes hospitalisés pour leptospirose [205]. Un cas sévère de la maladie a été rapporté chez un homme allemand, de retour dans son pays douze jours après avoir participé à un championnat "Iron man" aux Philippines [210]. La maladie a aussi été diagnostiquée chez des coureurs après la course "Tchimbe-Raid" en forêt tropicale en Martinique en 2009 [211], ainsi que suite à la course d'endurance "USARA National Championship" qui a eu lieu en Floride en 2005 [212].

D'autres cas de leptospirose ont été liés à différentes pratiques sportives, notamment le rafting [206, 213] ou le canoë-kayak [214]. Un spéléologue américain a contracté la maladie

suite à une expédition en Malaisie ; la maladie s'est déclarée dix jours après sa dernière exploration spéléologique, malgré un traitement préventif à base de doxycycline (100 mg par jour) [215].

La leptospirose est endémique dans de nombreux pays tropicaux, ce qui implique que les voyageurs qui s'y rendent sont aussi une population à risque, au même titre que les autochtones [216, 217]. Ainsi, avec l'augmentation de la pratique de loisirs de pleine nature par les touristes visitant les pays tropicaux, la leptospirose pourrait devenir une maladie fréquente des services de médecine tropicale des pays riches tempérés.

CHAPITRE III

LA LEPTOSPIROSE, UNE MALADIE (RE-) EMERGENTE ?

D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, une maladie émergente est une maladie qui apparaît dans une population pour la première fois, ou qui a existé précédemment, mais dont l'incidence et/ou la répartition géographique a rapidement augmentée (http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/). Cette définition purement épidémiologique, inclut indifféremment la mise en évidence de "nouvelles" maladies avec de "nouveaux" germes pathogènes, et la réapparition ou la résistance au traitement de maladies déjà connues. Il est nécessaire de différencier "l'émergence" effective d'une maladie d'une augmentation du nombre de cas due à un meilleur diagnostic ou liée à une épidémie ponctuelle [64, 218].

De multiples facteurs contribuent à l'émergence des zoonoses, certains sont d'origine naturelle, mais dans leur grande majorité, ces facteurs sont, directement ou indirectement, d'origine anthropique :

- Migrations et transports (d'animaux et de marchandises),
- Densité de population et comportements caractéristiques des hôtes,
- Aménagement du territoire (voirie, gestion des déchets, gestion des eaux usées...),
- Influence de l'environnement (écologie et climat),
- Facteurs iatrogènes,
- Évolution naturelle des agents pathogènes par phénomène de mutation ou de sélection naturelle,
- Immunité naturelle des hôtes.

La leptospirose est considérée par de nombreux auteurs comme une maladie (ré)émergente chez l'Homme [219, 220, 221, 222, 223, 224, 225]. Elle est aussi considérée comme une maladie émergente chez le chien [3, 226]. Nous aborderons dans ce chapitre quelques facteurs d'émergence/ré-émergence de cette maladie.

1. Emergence du syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS, Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome)

L'émergence de formes cliniques graves telles que le syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS) est décrit dans diverses zones [103]. Gouveia *et al.* [104] décrivent l'émergence du SPHS à Salvador, au Brésil où cette forme clinique grave de la leptospirose n'était pas décrite avant 2003, alors que 47 cas ont été décrits entre 2003 et 2005. L'augmentation du nombre de cas de SPHS dans une région peut être due à un meilleur diagnostic de la maladie ou à l'émergence effective de ce syndrome [104].

A Buenos Aires, en Argentine, 276 cas de leptospirose ont été diagnostiqués entre 1900 et 1999. Aucun syndrome pulmonaire hémorragique n'a été décrit chez ces patients. En 2000 et 2001, 93 cas de leptospirose ont été rapportés dans cette même région, dont une épidémie de 47 cas en mars 2001. Quatre patients sont morts, chez trois d'entre eux, le diagnostic de leptospirose a été confirmé biologiquement. Deux de ces patients sont morts suite à des hémorragies pulmonaires sévères, constituant les premiers cas documentés de cette forme clinique dans la région de Buenos Aires [227].

L'"émergence" d'une forme clinique peut avoir pour origine l'introduction ou la découverte d'un nouveau sérovar dans une région, comme la souche *L. borgpetersenii* groupe B décrite à Mayotte en 2012 [228], la dominance d'un clone/variant pathogène, écologiquement plus adapté au milieu, et dont la virulence est supérieure aux génotypes habituellement rencontrés dans la région [64, 228], ou encore une meilleure détection/reconnaissance de cette forme clinique en relation avec un pathogène connu.

2. Emergence liée aux nouvelles activités de loisirs et à la mondialisation des échanges

Historiquement, les travailleurs ayant des contacts directs avec les réservoirs animaux, en particuliers les éleveurs de bovins et de cochons, les travailleurs en abattoirs, les vétérinaires, les éleveurs laitiers et les populations rurales étaient considérés comme les plus exposés à la contamination par des leptospires. Cette épidémiologie est toujours observée dans les pays en voie de développement [182, 186, 229, 230, 231] alors que l'exposition liée à

des activités de loisirs amenant au contact des eaux douces [9, 232], est aujourd'hui la cause la plus fréquente d'infection par *Leptospira* dans les pays développés (bien que l'exposition liée aux activités rurales soit toujours la cause d'un nombre non négligeable de cas [225]).

L'augmentation des échanges internationaux et le développement d'activités en zones tropicales induit l'introduction de cas de leptospirose dans des pays occidentaux à partir de pays tropicaux, et l'émergence de la leptospirose en tant que maladie de loisir [216, 221].

En effet, les pays tropicaux bénéficient d'une popularité grandissante en tant que destinations de vacances, souvent en lien avec des activités à fort risque de contamination, telles que le rafting, le trekking dans la jungle ou la forêt tropicale, la spéléologie [216, 221]. Les athlètes sont de plus en plus friands de challenges extrêmes, tels que les ultratrails, ultramarathons, triathlons, événements multisports...dans des endroits de plus en plus lointains (forêts, montagnes, déserts...) qui augmentent le risque d'infection par des agents pathogènes tels que *Leptospira* [233].

En Australie, l'observation des cas entre 1998 et 2004 révèle un changement dans l'épidémiologie de la maladie, avec un risque accru d'infection lors d'activités de loisir plutôt que lors d'exposition professionnelle, cette dernière comptant seulement pour 18% de la totalité des cas sur cette période [197]. Cette tendance s'est confirmée ensuite, et en 2008, avec environ 35% des cas rapportés au centre national de surveillance australien qui étaient liés à des voyages à l'étranger et/ou à des activités de loisirs, notamment 19% des infections acquises en-dehors du pays. Des observations similaires ont été faites dans d'autres pays développés, comme à Hawaï où l'incidence locale, très élevée, est attribuée pour 0% à des activités de loisir dans les années 1970, alors que cette proportion s'élève à 50% dans les années 1990 [188].

La leptospirose est aussi considérée comme une infection ré-émergente en Californie avec une augmentation croissante du nombre de cas apparaissant suite à une exposition au cours d'activités aquatiques. En effet, 59% des infections rapportées entre 1982 et 2001 étaient liées aux loisirs, tandis que la proportion monte à 85% entre 1997 et 2001, avec de surcroît une augmentation du pourcentage de cas liés à des voyages dans des destinations tropicales [224].

Le passage de la leptospirose d'une maladie d'origine professionnelle à une maladie de loisirs et de voyage est observé aux Pays-Bas, en Italie, au Portugal, en Bulgarie, mais aussi en France [168, 173, 198, 234, 235]. Par ailleurs, plus de la moitié des infections leptospirosiques au Royaume-Uni sont aujourd'hui acquises à l'étranger, principalement dans

des pays tropicaux ou subtropicaux [236]. En Israël, 42% de la totalité des cas de leptospirose entre 2002 et 2008 ont été diagnostiqués chez des voyageurs, la plupart d'entre eux ayant été infectés en Asie du sud-est, et la majorité ayant participé à des activités aquatiques [237]. En Allemagne, les voyages internationaux sont aujourd'hui le facteur de risque le plus important d'exposition à la leptospirose, comptant pour 16% des cas [238]. En Suède, on observe aussi un nombre non négligeable de cas de leptospirose chez des voyageurs revenant de zones tropicales [239].

3. Emergence liée au changement climatique

La survie des *Leptospira* pathogènes en-dehors de l'hôte dépend largement des conditions d'humidité et de chaleur [156, 157]. La survie dans le milieu extérieur contribue au maintien du cycle d'infection chez les réservoirs animaux, et à une augmentation du risque d'infection chez les hôtes sensibles, dont l'Homme.

Le réchauffement climatique, l'augmentation des précipitations au niveau mondial et l'augmentation de fréquence des événements climatiques extrêmes contribuent à l'augmentation globale de l'incidence de la leptospirose [221, 240], voire à son émergence dans certaines régions. Le phénomène de changement climatique mondial laisse supposer que beaucoup de régions sont susceptibles de souffrir de pluies et d'inondations plus fortes et plus fréquentes dans les prochaines décennies [241, 242]. Or, les zones inondables sont des zones à risque accru d'infection par la leptospirose [169, 171, 177] et les cyclones contribuent largement à ce phénomène [170, 243]. Aussi bien dans les pays développés qu'en voie de développement, les inondations et autres désastres naturels peuvent aussi augmenter le risque d'infection par *Leptospira* sp. en perturbant les services et les infrastructures de santé publique, en provoquant des dommages sur les réseaux d'eaux et les réseaux sanitaires, par déplacement des populations, en causant des dommages sur les habitations et en augmentant l'exposition environnementale à la bactérie [244]. Notons que les infections liées à l'alimentation ou à l'eau sont fréquentes après une inondation, et certaines peuvent être difficiles à différencier cliniquement de la leptospirose. Par exemple, les hépatites A et E sont communément observées dans des pays en voie de développement, pouvant occasionner des syndromes d'hyperthermie et d'ictère, fréquemment retrouvés chez des patients atteints de leptospirose [244].

Par conséquent, il est aujourd'hui admis que l'incidence de la leptospirose risque d'augmenter sous l'effet de l'actuel changement climatique global [245, 246].

4. Urbanisation, exode rural et pauvreté

Depuis la fin du XX^e siècle, des épidémies importantes, rurales et urbaines, de leptospirose ont été observées sur tous les continents. Des milliers de cas et des centaines de décès ont été recensés, et les zones défavorisées telles que les bidonvilles en périphérie des grandes agglomérations ont été les plus touchées. Il est très probable que l'augmentation de la population (estimée à environ 70 millions de personnes par an [247]) et de l'urbanisation mondiale au cours du XXI^e siècle favorisera l'augmentation de ce phénomène [221].

Aux Philippines, les patients atteints de leptospirose sont le plus souvent résidents de zones urbaines ou péri-urbaines inondables, telles que la métropole de Manille. Dans cet archipel, la leptospirose est associée principalement aux fortes précipitations, notamment sous l'influence de la mousson ou de cyclones, à l'urbanisation rapide (due à l'augmentation dramatique de la population), à la déforestation, à l'augmentation du nombre de secteurs propices aux inondations, mais aussi à la pauvreté des infrastructures [248]. Depuis les années 1960, la surface boisée des Philippines a diminué de 40%. Or, les arbres ont un rôle important dans l'absorption de l'eau, en particulier en saison des pluies, et constituent un moyen de lutte naturel limitant les inondations. A cause de cette déforestation, une grande partie des Philippines est désormais constituée de zones continuellement inondées en saison des pluies, en particulier la région de Manille [248].

A Rio de Janeiro, les plus fortes incidences de la leptospirose ont été identifiées dans les zones sensibles aux inondations, et qui connaissent les plus mauvaises conditions sanitaires et de pauvreté [169]. De plus, les zones pauvres sont aussi celles où sont présentes des décharges à ciel ouvert et des dépôts d'ordures, qui constituent une source de nourriture et un habitat pour les populations de rats, principaux vecteurs de la maladie [184].

McBride *et al.* [128] estiment que la leptospirose est un problème de santé publique majeur dans les pays en voie de développement, notamment en Asie et en Amérique Latine, à cause de la pauvreté, en particulier des mauvaises conditions sanitaires [128]. Par conséquent, dans les communautés vivant dans des bidonvilles, avec un très fort taux d'extrême pauvreté,

les différences socio-économiques relatives contribuent à un taux d'incidence inégal vis-à-vis de la leptospirose [169, 184].

5. Perte de biodiversité mammalienne

L'équilibre des écosystèmes joue un rôle essentiel dans la régulation des maladies, et par conséquent, cet équilibre doit être conservé afin de maintenir la santé des populations humaines. La rupture de l'équilibre des écosystèmes, et en particulier la perte de biodiversité [249], augmente le risque de transmission de nombreuses maladies, dont les hantavirus [250], le virus West Nile [251], la maladie de Lyme [252], le virus Ross River [253], le paludisme [254] mais aussi probablement de la leptospirose [255].

Derne *et al.* [255] ont montré que, pour une unité écologique donnée (une île), l'incidence de la leptospirose chez l'Homme était négativement corrélée au nombre d'espèces de mammifères terrestres. Par ailleurs, si la richesse en espèces mammaliennes augmente, la diminution de l'incidence de la leptospirose devient de plus en plus faible à chaque nouvelle espèce supplémentaire [255].

Le rat est une espèce envahissante, généraliste et prolifique, qui se développe dans des environnements aussi bien anthropisés que naturels [256]. Par ailleurs, les rats sont souvent la source des cas humains de leptospirose, car réservoirs principaux du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*, le plus fréquemment retrouvé dans les cas humains [176, 184, 257, 258]. On peut émettre l'hypothèse que la diversité mammalienne diminue l'incidence de la leptospirose par un phénomène de dilution, qui réduit les interactions hôte-hôte par la présence d'autres espèces, réduisant ainsi les opportunités de transmission d'un pathogène, et/ou par un phénomène de biorégulation des populations de rats, donc de la transmission de la bactérie, par des interactions compétitives ou de prédation avec les autres mammifères [255]. L'absence d'association significative entre la richesse spécifique totale et l'incidence de la leptospirose (alors que l'association avec la richesse spécifique en mammifères terrestres est significative) suggère que la biodiversité générale est moins importante que la biodiversité mammalienne pour résister à l'invasion par les rats [255].

Ainsi, globalement, la préservation des écosystèmes et de la biodiversité endémique induit généralement une diminution de la prévalence des maladies infectieuses [249, 259, 260].
--

6. La leptospirose : une maladie émergente chez les animaux ?

La leptospirose canine a été décrite comme une maladie ré-émergente en Amérique du Nord dans le milieu des années 1990, avec un changement dans l'épidémiologie : le changement des sérovars infectants y a été jugé responsable de cette ré-émergence. Historiquement, les sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae étaient prépondérants chez les chiens en Amérique du Nord, mais la vaccination a permis un déclin du nombre de chiens infectés par ces deux sérovars entre les années 1970 et le milieu des années 1990 [223]. Cette diminution a été attribuée à l'introduction d'un vaccin canin efficace au début des années 1970 [261, 262]. Depuis le milieu des années 1990 cependant, les observations montrent une apparente ré-émergence de la leptospirose canine associée à un changement des sérovars infectants [223]. Les sérovars les plus souvent retrouvés depuis cette ré-émergence sont les sérovars Grippotyphosa et Pomona [263, 264]. Il semble que cette ré-émergence et les changements dans l'épidémiologie des sérovars infectants soient dues au peuplement (dans les années 1980 et 1990) de zones anciennement rurales, qui a induit une plus grande fréquence de contact entre les animaux domestiques et notamment de compagnie et le réservoir sauvage [264]. Aux Etats-Unis, les réservoirs connus du sérovar Bratislava sont les porcs, et probablement les chevaux, les bovins ; les réservoirs connus du sérovar Pomona sont les mouffettes (putois) et les opossums ; et les réservoirs connus du sérovar Grippotyphosa sont les rats laveurs, les mouffettes les opossums [265].

Les études sur la résurgence de la leptospirose canine en Amérique du Nord révèlent des conclusions conflictuelles concernant les facteurs de risque tels que l'âge, le sexe ou la race des chiens [263, 264, 266]. A l'inverse, les facteurs de risque environnementaux tels que l'augmentation des précipitations, des températures plus élevées, et la saisonnalité des cas sont constamment identifiés [262, 265, 266, 267, 268].

Entre 2006 et 2010, une augmentation du nombre de chiens suspects de leptospirose a été observée à la clinique des petits animaux (Freie Universität) de Berlin. Plus de deux tiers de ces chiens avaient des manifestations cliniques et des signes pulmonaires visibles à la radiologie, associés à une insuffisance rénale et hépatique [269]. La leptospirose est en augmentation dans la région rurale de Berlin. Dans cette région, la population de sangliers

sauvages est en dramatique augmentation et une étude montre que cette population de sangliers est un réservoir important pour différents sérovars de *Leptospira* [270].

Par ailleurs, les zones rurales semblent induire un plus fort risque d'infection [263] car cet environnement héberge un grand nombre d'animaux de rente, de rongeurs, de petits mammifères, qui sont des réservoirs typiques de *Leptospira* [271, 272]. De plus, les zones rurales ont généralement davantage de points d'eau stagnante, tels que des canaux d'irrigation ou des réservoirs d'eau [263].

La **Figure 8** résume les facteurs d'émergence d'une maladie infectieuse.

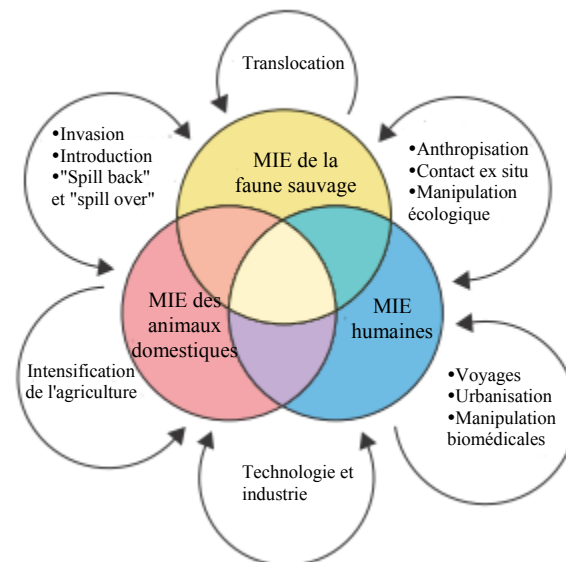


Figure 8 : Le continuum hôte-pathogène.

La plupart des maladies infectieuses émergentes (MIE) existent à l'intérieur d'un continuum entre la faune sauvage, la faune domestique, et les populations humaines. Peu de maladies n'affectent qu'un seul groupe, et les relations complexes entre les populations d'hôtes mettent en scène l'émergence de maladies. Les flèches montrent quelques facteurs clé conduisant à l'émergence d'une maladie (d'après [273]).

"Spill over" : processus par lequel des pathogènes se transmettent d'une population hôte réservoir (souvent des espèces domestiques) fortement infectée à une population hôte sauvage sympatrique non réservoir [273].

"Spill back" : processus par lequel des espèces sauvages deviennent réservoir de pathogènes circulant localement chez les espèces domestiques et les retransmettent à ces dernières [273].

CHAPITRE IV

LA LEPTOSPIROSE ANIMALE

1. Rôle des animaux dans l'épidémiologie de la leptospirose : la notion d'hôte réservoir et d'hôte sensible

Un "réservoir" est un système écologique (biotope et biocénose) dans lequel un agent (zoonotique) survit indéfiniment [274]. Il comprend donc l'ensemble des populations hôtes ainsi que les hôtes intermédiaires ou vecteurs (le plus souvent invertébrés) et leur biotope [275].

Un "hôte" est un être vivant qui héberge et entretient dans des conditions naturelles un agent pathogène [275].

Un "hôte accidentel" est infecté à partir du réservoir, mais n'est pas nécessaire au maintien de la population d'agents (zoonotiques) [274].

Un "hôte réservoir" concourt à la survie de l'agent (zoonotique) [274].

Bien que cette notion soit discutable, on distingue généralement deux catégories d'hôtes animaux (Homme y compris) dans l'épidémiologie de la leptospirose :

- Les hôtes accidentels, sensibles, avec des signes cliniques allant de bénins à mortels ;
- Les hôtes réservoirs, que l'on peut qualifier de "tolérants" car la bactérie a un impact mineur sur eux. Chez ces hôtes asymptomatiques, il s'établit un "équilibre" biologique avec *Leptospira*, [276].

La plupart des mammifères peuvent être infectés par des leptospires pathogènes [24]. Différents sérovars de *Leptospira* sont "associés" à un ou plusieurs "hôtes de maintien" (**Tableau 5**), dont les populations servent de réservoirs sur le long terme [73]. De plus, une même espèce peut être réservoir de différents sérovars/sérogroupe selon la région géographique. Ainsi, la petite mangouste indienne, *Herpestes javanicus*, est l'hôte de maintenance des sérogroupe Canicola, Sejroe et Icterohaemorrhagiae à Hawaïi [277, 278, 279], du sérogroupe Sejroe sur l'île d'Oahu [280], des sérovars Icterohaemorrhagiae et Djatzi à Puerto Rico [281], des sréogroupes Icterohaemorrhagiae, Sejroe et Australis en Guadeloupe [282, 283], du sérogroupe Canicola à la Trinité (Antilles) [284, 285] et aux sérovars Atchafalaya, Copenhageni et Brasiliensis à Grenade (Antilles) [284, 285].

Tableau 5 : Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de *Leptospira* (d'après [73, 286]).

Hôte réservoir	Sérovar(s)
Porc	Pomona, Tarassovi
Bovin	Hardjo, Pomona
Cheval	Bratislava
Chien	Canicola
Mouton	Hardjo
Cerfs	Hardjo
Raton laveur	Grippotyphosa
Rat	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Souris	Ballum, Arborea, Bim
Marsupial	Grippotyphosa
Chauve-souris	Cynopteri, Wolffii

La relation entre un hôte de maintien et le sérovar est caractérisée par une transmission efficace, une forte séroprévalence (supérieure à 50%), et un portage rénal asymptomatique et chronique [286].

Des travaux récents suggèrent que des interactions moléculaires spécifiques entre la bactérie et l'hôte entrent en jeu permettant l'appariement spécifique mammifère-sérovar [287].

Rattus sp. est le réservoir le plus connu et le plus répandu de *Leptospira* [64, 176, 184, 257, 258, 288, 289, 290, 291, 292]. Néanmoins, diverses études ont montré que différents rongeurs pouvaient héberger des leptospires et étaient susceptibles de contaminer l'environnement.

La diversité des réservoirs possibles de *Leptospira* en fonction de la région géographique et du milieu écologique laisse entrevoir les grandes possibilités dans les modes de transmission et dans l'épidémiologie.

Nous ne listerons pas ici de manière exhaustive les différents réservoirs animaux prouvés ou suspectés, mais nous rappellerons notamment le rôle, trop souvent négligé, de la souris domestique, *Mus musculus* [290, 293, 294, 295, 296, 297] dans le cycle de transmission de la leptospirose, ainsi que quelques espèces de rongeurs chez lesquelles *Leptospira* a été isolée : le ragondin, *Myocastor coypus* [298, 299, 300, 301, 302], le rongeur africain ("*multimammate mouse*"), *Mastomys natalensis* [155, 296], la souris de plage ("*oldfield mouse*"), *Peromyscus polionotus*, et le rat du coton ("*cotton rat*"), *Sigmodon hispidus* aux Etats-Unis [294], le mulot des champs, *Apodemus agrarius*, le mulot à collier roux

Apodemus flavicolis, tous deux présents en Europe [295], le rat musqué, *Ondatra zibethicus* [301], etc.

Leptospira a aussi été isolée à partir de mammifères insectivores tels que les musaraignes des genres *Suncus* [303, 304] ou *Crocidura* sp. [296].

Parmi les carnivores sauvages, la mangouste indienne, *Herpestes javanicus* est considérée comme réservoir de leptospirose dans différentes régions telles que les îles de Hawaii [277, 278, 280], Trinidad et Grenade [284, 285], la Guadeloupe [283], ou la Barbade [297], mais d'autres espèces de mangoustes peuvent aussi être réservoir, telle que *Herpestes urva* à Taiwan [305].

La présence de rats autour du domicile [91, 184, 306] est retrouvée comme facteur de risque chez les patients séropositifs. Les fluctuations dans les populations de rongeurs peuvent influencer la saisonnalité de la leptospirose [307]. Les variations dans l'incidence des cas peuvent être localement corrélées à la saison de reproduction des rongeurs [155] : à la saison des mises-bas, un grand nombre de jeunes de l'année, indemnes, peuvent s'infecter et excréter de grandes quantités de leptospires, ce qui induit une période de forte transmission de la bactérie dans la population de rongeurs, puis un pic dans l'incidence des cas humains. Par ailleurs, les mouvements des populations de rongeurs et des populations humaines peuvent aussi être fortement saisonniers et expliquent souvent la saisonnalité observée dans l'incidence des cas chez l'homme [307].

De nombreuses études montrent le rôle du chien comme réservoir zoonotique de *Leptospira*, en Europe, aux Etats-Unis, au Brésil, en Colombie, au Nicaragua, au Japon, etc. [93, 141, 262, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319]. Autrefois considéré comme hôte sensible, on sait aujourd'hui que le chien peut être excréteur durable de *Leptospira*, parfois même malgré la mise en œuvre d'un traitement antibiotique adapté [320]. Il semble que lorsqu'il est infecté par *L. interrogans* séro groupe Icterohaemorrhagiae le chien soit un hôte sensible et que l'infection induise des signes cliniques, par contre, lorsqu'il est infecté par *L. interrogans* séro groupe Canicola, le chien est un hôte "tolérant", réservoir asymptomatique de la bactérie.

Une épidémie de leptospirose a été rapportée chez les chiens entre 2004 et 2006 dans l'ouest de l'état de Washington, et trois cas d'infection locale chez des hommes ont été signalés en 2005 [302]. Par ailleurs, une étude irlandaise a montré que 7% des chiens

domestiques excrétaient des leptospires dans leurs urines [314], et une leptospirurie a aussi été mise en évidence par PCR chez près de 9% des chiens lors d'une étude aux Etats-Unis [321].

Les milieux permettant des interactions rapprochées entre les chiens et la faune sauvage constituent un risque majeur d'infection pour les chiens domestiques ou errants [263]. Enfin, les carnivores errants sont aussi exposés à *Leptospira* par la consommation de proies telles que des rongeurs [322], permettant ainsi le transfert d'un cycle sauvage à un cycle urbain et l'introduction de certains sérovars en zone urbaine. Ces résultats montrent l'importance globale de la leptospirose canine et son fort potentiel zoonotique.

La vaccination des chiens domestiques n'empêche pas la contamination par *Leptospira* et l'excrétion urinaire de l'agent pathogène, alors même que l'animal reste asymptomatique [311]. Juvet *et al.* [320] ont décrit le cas d'une chienne de 5 ans, vaccinée contre la leptospirose dans les 6 mois précédents, et référée à l'Université Vétérinaire de Dublin pour hyperthermie, ictère, anorexie et vomissements depuis 5 jours. La chienne avait été traitée par injections intraveineuses (IV) de pénicilline pendant 4 jours. Une concentration importante de spirochètes a été retrouvée dans les urines de l'animal (par observation au microscope à fond noir) le jour de la consultation. Un traitement à base de pénicilline a été administré pendant 5 jours (10 mg/kg de benzylpenicilline en IV toutes les 12 heures), puis, du 6^{ème} au 12^{ème} jour, 10 mg/kg de doxycycline ont été administrés par voie orale toutes les 12 heures. Le 13^{ème} jour, la chienne ne présentait plus de symptômes cliniques, mais l'excrétion urinaire de spirochètes était toujours observable. Un traitement supplémentaire avec 15 mg/kg de streptomycine par voie intramusculaire, toutes les 12 heures pendant 3 jours a été donné et le traitement à base de doxycycline a été prolongé pendant 15 jours. Le 16^{ème} jour, aucun leptospire n'était détecté dans les urines [320].

Ce cas montre que, malgré un traitement antibiotique adapté, un chien domestique présentant une atteinte aiguë de leptospirose, représente un risque zoonotique important pour ses propriétaires [320]. Cet article souligne aussi l'intérêt de prolonger le traitement après l'arrêt des symptômes cliniques [320].

<p>L'exemple des canidés, hôtes "sensibles" et "réservoirs" de leptospires (à <i>Icterohaemorrhagiae</i> et <i>Canicola</i> respectivement) montre l'ambiguïté de la distinction épidémiologique entre "hôtes sensibles" et "hôtes réservoirs", puisque la sensibilité d'une espèce animale peut varier en fonction de la souche/du sérogroupe.</p>

La détection d'anticorps sériques chez un animal signifie qu'il a été en contact avec *Leptospira*, néanmoins la sérologie ne permet pas de dater l'infection car le taux d'anticorps ne lui est pas corrélé [13, 226, 323] et il existe des variations individuelles dans la cinétique des anticorps.

L'examen sérologique seul ne permet pas de déterminer si un animal est un hôte "réservoir" de la leptospirose.

Lors de la phase aigüe de l'infection, les réactions croisées sont fréquentes. On parle de réaction paradoxale lorsque les plus forts taux d'anticorps sont détectés pour des sérogroupe hétérologues au sérogroupe responsable de l'infection en cours [13]. Les réactions paradoxales peuvent apparaître dans 50% des cas [323]. En phase aigüe de la maladie, le MAT ne permet pas de déterminer le sérogroupe infectant de façon certaine [323, 324].

Lorsqu'il est infecté, un animal synthétise des anticorps qui lui permettent généralement d'éliminer la bactérie des principaux organes et du système circulatoire ("clairance") excepté les reins, où la bactérie peut se loger durablement [276, 325]. L'animal peut alors devenir porteur rénal de leptospires. S'il devient un porteur chronique ("animal réservoir"), il peut ensuite excréter la bactérie : de façon continue ou discontinue, toute sa vie ou transitoirement puis l'éliminer [325] (**Figure 9**).

Montrer qu'un animal est porteur rénal de leptospires est une indication que cet animal peut être un réservoir de la bactérie. Néanmoins, étant donné que l'excrétion urinaire est transitoire, le statut de "porteur rénal" ne signifie pas que cet animal contamine l'environnement ou qu'il est infecté de manière chronique [326] (un hôte accidentel, animal ou humain, peut être transitoirement porteur de leptospires dans ses reins et excréteur [274]).

Si après une première réponse immunitaire (synthèse d'anticorps) l'hôte n'est jamais recontaminé, son taux d'anticorps baisse et il peut redevenir séronégatif [51, 292, 327], alors même que ses reins peuvent être colonisés par des leptospires et qu'il peut être excréteur urinaire [328].

Lors d'une infection ultérieure due au même sérovar que celui impliqué dans la primo-infection, le taux d'anticorps vis-à-vis de ce sérovar augmente plus rapidement que lors de la primo-infection par ce sérovar (mémoire immunitaire) [329].

Si la seconde infection est due à un sérotype différent de la primo-infection, le test sérologique (MAT) peut refléter deux types de réponses immunitaires :

- Seul le titre en anticorps dirigés contre le sérotype infectant augmente ;
- Le titre en anticorps dirigés contre le sérotype infectant augmente mais le/les taux d'anticorps dirigés contre le/d'autres sérotype(s) impliqué(s) dans les infections précédentes augmente(nt) aussi (réponse anamnétique) [13].
(Figure 9).

S'il s'agit d'un animal préalablement vacciné contre *Leptospira*, les réponses sérologiques possibles lors d'une primo-infection et lors des contacts suivants seront celles décrites pour une infection secondaire.

Lors du second contact avec *Leptospira* et lors des contacts suivants, la bactérie peut s'installer au niveau rénal, comme lors de la primo-infection. La possibilité de portage rénal simultané de plusieurs sérovars semble possible mais n'est que peu rapportée [292].

PRIMO-INFECTION

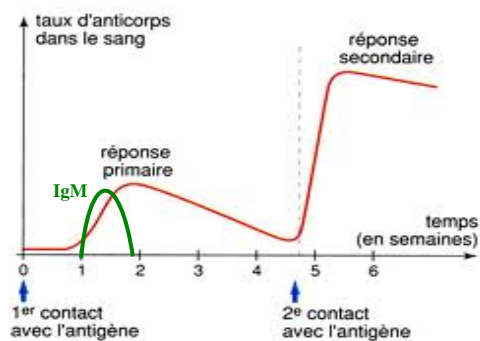
Leptospire du
séro groupe **A**



Leptospire du
séro groupe **B**



MÊME ANIMAL, 2^{NDE} INFECTION
(souche différente de la primo-infection)

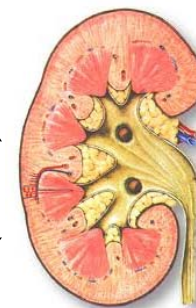


↗ IgM antiA
↗ IgG antiA

↗ IgM antiB
↗ IgG antiB

↗ IgM antiB
↗ IgG antiB
+ Stimulation de la réponse mémoire
↗ IgG antiA

Colonisation rénale et
excrétion urinaire



Transitoire

Portage
chronique

Élimination

"Animal réservoir"

Figure 9 : Représentation simplifiée des réponses immunitaires possibles chez un animal infecté par *Leptospira*.

2. Signes cliniques chez quelques espèces domestiques

2.1. Chien

L'infection par *Leptospira* chez le chien est probablement inapparente dans la majorité des cas [330]. Lorsqu'elle s'exprime, la maladie est de sévérité variable, dépendante de la souche infectante, elle-même liée à la localisation géographique, et de la réponse immunitaire de l'hôte. Certains chiens montrent des signes mineurs ou moyens de l'infection, alors que d'autres développent une maladie sévère pouvant conduire à la mort. La leptospirose aiguë est caractérisée chez le chien par une hyperthermie, une anorexie, des douleurs abdominales, des vomissements, une insuffisance rénale et hépatique avec ictère. On peut aussi observer une tachycardie, des hémorragies pulmonaires (**Figure 10**) ou digestives. Dans les cas chroniques (rares), on peut observer une uvéite ou des troubles de la reproduction comme des avortements par exemple [226, 311, 331, 332, 333, 334]. Les anomalies pulmonaires sont très fréquentes (dyspnée, radiographie pulmonaire anormale) [333] et la clinique ressemble à celle retrouvée chez l'homme [269]. La maladie est souvent fatale lorsqu'elle n'est pas traitée rapidement.

La maladie chez les chiens est généralement causée par *L. interrogans* et *L. kirschneri* [335]. *L. wolfii* a été identifié chez des chiens en Iran, mais son rôle en tant que pathogènes chez le chien demande encore à être confirmé [336]. *L. noguchii* a été isolé chez un chien malade au Brésil [337]. Les sérovars les plus communément retrouvés chez le chien avant l'introduction de la vaccination il y a 30 ans étaient Icterohaemorrhagiae (responsable de formes graves) et Canicola (fréquemment en portage chronique), mais depuis l'introduction du vaccin bivalent contenant ces deux souches, d'autres sérovars deviennent fréquents dans l'espèce canine, dont Grippotyphosa, Pomona, Bratislava, Pyrogenes, Sejroe et Autumnalis [268, 302, 334, 335, 338, 339, 340].

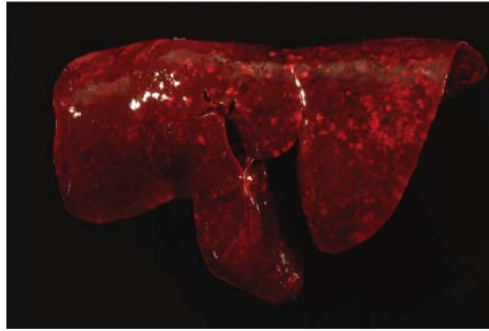


Figure 10 : Poumon de chien atteint d'hémorragie pulmonaire aiguë diffuse sévère.

Photographie prise lors de l'autopsie d'un chien atteint de forme clinique sévère de leptospirose, Berlin, étude conduite entre 2006 et 2010 [269].

La vaccination protège l'animal vis-à-vis des symptômes aigus, mais ne prévient pas toujours de l'infection si l'animal est exposé à une forte concentration de bactéries ou si la souche est très invasive [341]. Pour l'espèce canine, des vaccins bivalents contenant les valences *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* sont commercialisés depuis le début des années 1970 [223] dans différentes régions telles que l'Europe, l'Afrique du Sud, l'Australie et l'Amérique du Nord et protègent normalement contre l'apparition de symptômes cliniques dus aux sérogroupes *Canicola* et *Icterohaemorrhagiae* [226]. La protection vaccinale étant spécifique de séro groupe, les chiens vaccinés avec le vaccin bivalent ne sont pas protégés des infections par les autres sérovars tels que *Bratislava*, *Pomona* et *Grippotyphosa* [226, 342, 343]. De plus, l'urbanisation des zones rurales a augmenté le nombre de contacts entre les chiens et la faune sauvage (notamment ragondins, moufettes, et opossums aux Etats-Unis, qui sont les réservoirs de ces sérogroupes), mais aussi entre les chiens et les animaux de rente et les effluents d'élevage [223, 343]. Ces facteurs ont entraîné un changement dans l'épidémiologie de la leptospirose canine qui nécessite aujourd'hui de revoir les valences des vaccins commercialisés pour cette espèce. Des données sérologiques récentes ont montré qu'aux Etats-Unis les sérovars *Grippotyphosa* et *Pomona* sont actuellement en train de supplanter les sérovars *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*. C'est pourquoi, des vaccins contenant les valences *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, et *Pomona* sont maintenant disponibles en Amérique du Nord [226, 265, 334, 344]. Par ailleurs, *Grippotyphosa* est aussi le séro groupe responsable de la majorité des leptospiroses canines en Allemagne [345], République Tchèque [346], Slovaquie, Pologne, Croatie, Suisse [334] et Italie [347].

La durée de vie des anticorps vaccinaux est peu connue pour l'espèce canine. Hartman *et al.* [348] ont montré que, chez des chiens, la durée de vie des IgG après deux vaccinations

avec un vaccin commercial était de 3 mois. Tronel *et al.* [349] rapportent chez le chien une durée de protection vaccinale de 10 mois envers une infection due au sérovar Canicola (mais la durée de l'immunité contre une infection due au sérovar Icterohaemorrhagiae n'a pas été démontrée dans cette étude). Au contraire, d'autres auteurs montrent chez le chien une durée de protection vaccinale d'au moins un an après deux vaccinations avec un vaccin du commerce, avec un fort degré d'immunité contre l'infection rénale due au sérovar Canicola, et, par conséquent, une protection contre l'excrétion urinaire de la bactérie [341, 350, 351].

2.2. Chat

Des résultats sérologiques montrent que les chats sont exposés à *Leptospira*, mais la maladie clinique est rarement décrite [352, 353]. Les sérovars Canicola, Grippotyphosa et Pomona ont été isolés chez des chats [226, 352, 354]. Les infections expérimentales de chats montrent une leptospirémie et une leptospirurie mais la maladie n'est pas sévère [355]. Les chats peuvent être exposés à la bactérie dans l'environnement, ou par contact direct avec les rongeurs.

Agunloye *et al.* [356] ont montré une séroprévalence de la maladie de 9,2% sur une population de 87 chats de la région de Glasgow (Ecosse) [356]. Une étude sérologique menée sur 111 chats en Iran [353] a montré une séroprévalence de 27% parmi les chats domestiques et errants (seuil de positivité pour le MAT 1/100). La séropositivité est retrouvée pour *L. interrogans* sérovar Canicola, *L. interrogans* sérovar Pomona, *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo, *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae, *L. interrogans* sérovar Grippotyphosa [353].

Néanmoins, d'autres enquêtes épidémiologiques n'ont pas réussi à mettre en évidence une infection leptospirosique chez cette espèce [354, 357].

Il semble donc que le chat puisse être un hôte de *Leptospira*, et dans certains cas, pourrait être un réservoir contribuant à la contamination de l'environnement [353]. Néanmoins, le statut épidémiologique du chat envers la leptospirose reste peu étudié, donc très incertain et controversé. Il existe probablement des variabilités géographiques et/ou de souches qui expliqueraient les résultats contradictoires.

2.3. Cheval

L'infection des chevaux est souvent asymptomatique, mais des anticorps sont fréquemment mis en évidence chez des animaux sains [358]. Les principaux sérovars en cause lors d'infection chez les chevaux sont Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Autumnalis, Canicola, et Bratislava [358, 359, 360, 361, 362, 363].

Lorsque l'infection est cliniquement exprimée, elle se traduit par des avortements [360, 362, 364, 365, 366, 367], la naissance de prématurés [365, 368], des atteintes rénales [369, 370], des atteintes hépatiques ou par des atteintes générales chez le poulain. Toutefois, la forme clinique la plus fréquente est une uvéite qui, expérimentalement, intervient 12 à 24 mois après une inoculation de leptospires [371]. Cette uvéite qualifiée de "uvéite isolée du cheval" ne présente pas de caractères particuliers mais, si elle persiste ou si elle récidive (alors nommée "fluxion périodique"), elle est à l'origine de troubles de la vision et de lésions oculaires (atrophie de l'iris, opacification de la cornée et/ou du cristallin, blépharospasme, larmoiement, œdème de la cornée, hypopion, détachement rétinien, voire cécité) [372, 373, 374]. Différentes études ont permis d'isoler des leptospires à partir de prélèvements de corps hyalins de chevaux souffrant d'uvéite récurrente [109, 374, 375, 376, 377]. Toutefois, des études ont montré que la pathogénie de cette affection résulte d'une réaction immunitaire due à la présence de communautés antigéniques entre *Leptospira* spp. et les tissus oculaires (notamment cristallin et cornée, voir chapitre I) [111, 378, 379].

En France, l'uvéite isolée du cheval, quelle que soit son étiologie (la leptospirose n'est qu'une des étiologies possibles), est un vice rédhibitoire.

2.4. Bovin

Il semble que dans le monde, les bovins soient principalement infectés par *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo, type hardjobovis, pour lequel ils sont un hôte réservoir [73, 286]. Néanmoins, en fonction de la région géographique et des spécificités épidémiologiques locales, les bovins peuvent être infectés par une grande variété d'autres sérovars [9]. Les sérovars Hardjo et Bratislava, Grippotyphosa et Pomona sont les plus fréquents chez les bovins [73, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388]. Cependant, des leptospires des sérogroupes Hebdomadis et Pyrogenes ont été isolées au Zimbabwe chez des bovins à l'abattoir [389, 390], les sérovars Canicola et Copenhageni ont été isolés à partir d'urines de bovins au Brésil [382], et les sérogroupes Hebdomadis, Autumnalis, Grippotyphosa et Canicola ont été isolés chez des bovins en Inde [391]. A Trinidad, la sérologie montre que le

sérogroupe Icterohaemorrhagiae est le principal sérogroupe circulant dans le cheptel bovin de cette île [392].

Chez les ruminants, l'infection conduit généralement à un avortement au cours du dernier trimestre de gestation [393]. Le rôle des leptospires dans les avortements des bovins est estimé à 6% et 10% respectivement au Canada et aux Etats-Unis [394]. D'expression encore plus insidieuse, les conséquences de l'infection ne sont perceptibles qu'au niveau du cheptel. Des signes d'infertilité conduisent à des inséminations répétées, des intervalles sevrages-saillies fécondantes allongés [395], etc.

Dans certains cas d'infection aiguë les animaux présentent une anémie, un ictère, une hémoglobinurie, des signes de pneumonie et parfois des symptômes méningés. Deux à quatre mois plus tard, il est possible de noter des cas d'avortement et de mortinatalité. Une néphrite interstitielle peut être observée à l'abattoir [396]. Les sérovars Pomona et Hardjo sont à l'origine d'un syndrome fébrile, d'une anorexie et, chez les vaches laitières, de mammites, d'une chute importante voire totale de la sécrétion lactée durant une période de 2 à 10 jours [9, 397]. Le lait est de couleur jaune, il renferme des grumeaux et souvent du sang. Les répercussions sur la production de lait sont parfois les seuls signes observés. Cette forme clinique, appelée le "milk-drop syndrome", est souvent due au sérovar Hardjo [398, 399].

De plus, la colonisation du foie peut perturber le métabolisme hépatique comme la synthèse des porphyrines qui provoque parfois chez certaines races à peau non pigmentée comme la Charolaise, des signes spectaculaires de photosensibilisation avec perte de lambeaux entiers d'épiderme [395].

Enfin, *Leptospira* a été détecté dans le sperme de taureau, par conséquent, une transmission vénérienne de la maladie par monte naturelle ou par insémination artificielle est possible [400, 401, 402] et le taureau utilisé pour la saillie peut être l'élément épidémiologique clé d'un troupeau réservoir de la maladie.

2.5. Ovin et caprin

Chez le mouton, les formes frustes voire asymptomatiques sont les plus fréquentes [403]. Lors de leptospiroses aiguës (rares), on note de l'anorexie, un état d'abattement, une hémoglobinurie, un ictère, une anémie et une mortalité importante chez les agneaux. Dans la forme chronique, des néphrites ont été observées mais les signes cliniques les plus fréquents sont des troubles de la reproduction (mortinatalité et surtout avortements). Les principaux

sérovars retrouvés chez les petits ruminants sont les sérovars Grippytyphosa, Sejroe, Icterohaemorrhagiae et Tarassovi [9, 392].

Chez la chèvre, l'infection conduit à un ictère, à une hémoglobinurie, à une infécondité, à des avortements et à un taux de mortalité important chez les jeunes. Les sérovars les plus fréquents sont Grippytyphosa, Pomona, Icterohaemorrhagiae et Canicola.

Comme chez les bovins, une transmission vénérienne de la bactérie semble possible chez les petits ruminants [404].

2.6. Porcin

Chez le porc, les sérovars Pomona, Autumnalis, Tarassovi, Bratislava, Muenchen (sérogruppe Australis), et dans une moindre mesure Sejroe semblent les plus fréquents [405, 406, 407]. Les sérogroupes Pomona et Australis sont bien adaptés au porc [408]. Icterohaemorrhagiae et Canicola peuvent aussi être retrouvés chez cette espèce [137, 392].

Chez le porc, les leptospiroses s'expriment sous des formes très diverses [409] : formes inapparentes, formes subcliniques (néphrites interstitielles chroniques conduisant à la saisie des reins à l'abattoir), formes modérées (fièvre, anorexie, retards de croissance), formes sévères (fièvre, ictère, hémorragie, mort) [9]. Mais, les signes cliniques les plus fréquents et ayant le plus fort impact économique [409] consistent en des troubles de la reproduction (infertilité, avortements le plus souvent tardifs, contamination des porcelets par voie transplacentaire, mortinatalité) [137, 405]. Les porcs peuvent être infectés de façon chronique et être des réservoirs de leptospires [409].

Une transmission vénérienne de la bactérie, par contamination de la semence par les urines de l'animal infecté est décrite chez le porc [402, 410].

Chez les animaux, les signes cliniques sont variables en fonction de l'espèce et du sérovar infectant. La maladie circule plutôt à bas bruit dans les élevages de ruminants et de porcs, causant des problèmes de reproduction souvent non diagnostiqués et à l'origine de pertes économiques pouvant être importantes.

Il n'existe actuellement pas de vaccin contre les leptospiroses des bovins, petits ruminants et porcs possédant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France. Mais de nombreux pays, comme les Etats-Unis [411], utilisent la vaccination à grande échelle des

bovins et des porcs. Aux Etats-Unis, des vaccins à cinq valences (sérovirs Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, and Hardjo) sont utilisés chez les bovins. Ces valences vaccinales sont aussi disponibles en combinaison avec d'autres vaccins anti-bactériens ou anti-viraux. Cependant, ces vaccins, s'ils préviennent l'expression des signes cliniques, n'empêchent pas l'infection ni l'excrétion urinaire de la bactérie [53, 411]. De plus, ces vaccins ne sont que partiellement efficaces puisque restreints à un nombre limité de sérovirs [53].

Néanmoins, quelle que soit l'espèce, la vaccination ne prévient ni l'infection, ni l'excrétion urinaire ou l'acquisition d'un statut de réservoir [311, 320, 350].

3. La leptospirose animale dans les zones insulaires tropicales

Article 2 : Desvars A, Cardinale E, Michault A. 2011. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiology and Infection*, 139(2): 167-188.

REVIEW ARTICLE

Animal leptospirosis in small tropical areas

A. DESVARS¹*, E. CARDINALE¹ AND A. MICHAULT²

¹ Centre Régional de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes de l'Océan Indien (CRVOI), Sainte-Clotilde, La Réunion

² Service de Bactériologie Parasitologie Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Saint Pierre, La Réunion

(Accepted 10 August 2010; first published online 28 September 2010)

SUMMARY

Leptospirosis is the most widespread zoonosis in the world. Humans become infected through contact with the urine of carrier animals, directly or via contaminated environments. This review reports available data on animal leptospirosis in ten tropical islands: Barbados, Martinique, Guadeloupe, Grenada, Trinidad, New Caledonia, Hawaii, French Polynesia, La Réunion and Mayotte. Leptospirosis is endemic in these insular wild and domestic fauna. Each island presents a specific panel of circulating serovars, closely linked with animal and environmental biodiversity, making it epidemiologically different from the mainland. Rats, mongooses and mice are proven major renal carriers of leptospires in these areas but dogs also constitute a significant potential reservoir. In some islands seroprevalence of leptospirosis in animals evolves with time, inducing changes in the epidemiology of the human disease. Consequently more investigations on animal leptospirosis in these ecosystems and use of molecular tools are essential for prevention and control of the human disease.

Key words: Animal, epidemiology, island, leptospirosis, serovar, tropical.

INTRODUCTION

Leptospirosis is the most widespread zoonosis in the world but incidence of this disease is higher in tropical areas than in temperate countries [1]. Leptospirae are bacteria belonging to the family Leptospiraceae, order Spirochaetales. These spirochetes are about 0·1 µm in diameter and 6–20 µm in length [2]. The genus *Leptospira* includes saprophytic (*L. biflexa sensu lato*) and pathogenic (*L. interrogans sensu lato*) bacteria [3] and the serological classification allows discrimination between more than 260 serovars of

L. interrogans. Serovars that are antigenically related are grouped into serogroups but this classification is now challenged by a taxonomically more relevant genomic classification which distinguishes 13 pathogenic genomospecies [4]. Human infection most often occurs when mucous membranes or abraded skin are exposed to infected animal urine, contaminated water or soil, or infected animal tissue [2]. Many wild and domestic animals species have been identified as hosts of infecting leptospiral organisms and are able to maintain the leptospires in their kidneys and become chronic carriers, shedding the organisms in their urine [5]. Therefore, although the organism has been recovered from rats, swine, dogs, cattle, and numerous wild animals [6], micromammals (particularly rats)

* Author for correspondence: Miss A. Desvars, CIRAD Pôle Elevage, Station Ligne Paradis, 7 chemin Irat, 97410 Saint-Pierre, La Réunion.
(Email: amelie.desvars@cirad.fr)

remain the main chronic renal carriers of leptospires [7–9].

We choose to present a limited number of tropical insular areas, selected according to three criteria: (i) island located in the tropics, (ii) land surface of $<20\,000\text{ km}^2$ and (iii) availability of published data on animal leptospirosis. Thus, this review deals with the following islands: Barbados, Martinique, Guadeloupe, Grenada and Trinidad in the Caribbean Sea; New Caledonia, Hawaii and French Polynesia in the Pacific Ocean; and La Réunion and Mayotte in the Indian Ocean (Table 1) [10–13]. This review presents data on leptospirosis by island and by animal species chronologically (Tables 2 and 3) [14–24]. This data-gathering can be considered as a tool for those who work on leptospirosis in tropical islands. Knowledge on the animal reservoirs of *Leptospira* allows a better understanding of the epidemiology of the disease in these areas and also facilitates finding practical applications for control of the disease in humans.

All the areas described are tropical islands with a land surface area $<20\,000\text{ km}^2$. In these regions the climate has two contrasting seasons: a cool and dry season and a hot rainy season. Rainfall on the islands is principally orographic (mountain caused), with the resulting annual rainfall distribution closely following the topographic contours: amounts are greatest over the upper slopes and least on the leeward coast. Geologically, except for Barbados, all these islands are totally or partially of volcanic origin. Because of their small surface area and their isolation, for a given biogeographical area, islands have less species richness per surface unit than the mainland [25]. Moreover, animal populations are often small because of the limited surface area which reduces the capacity of housing. Each tropical island has its own fauna, but all are characterized by a high density of invasive rodents of the family Muridae [26, 27], rats (*Rattus* sp.) or mice (*Mus musculus*) [22, 23, 28]. Several hunting or wild species have also been introduced by humans [20, 22, 29] and domestic animals (dogs, cats) and livestock (cattle, goats, pigs, sheep, horses) are present in all the islands [22]. Except for Trinidad, which has a huge animal biodiversity, bats (order Chiroptera) represent generally the only endemic or indigenous terrestrial mammalian species of these ecosystems. On each island only a small part of the fauna has been studied for leptospirosis (Table 2) [15, 16, 18–23, 30–32]. In this review, we use the species taxonomic level in its Linnean designation. In consequence, domestic animals or wild animals born of

domestic forms, have the same Latin name as the wild ancestral species [33].

Two methods are commonly used to investigate leptospirosis in animals: the microscopic agglutination test (MAT) and the culture in a specific medium. The MAT is the gold standard test and is the one most utilized for the serological diagnosis of leptospirosis [34]. It is based on the use of agglutinating specific antisera and cross-absorption with homologous antigens. Authors can give the results of the MAT at the serogroup or at the serovar level. Serogroups corresponding to the serovars cited in this paper are given in Table 4 [2]. One limitation is that serological results depend on the number of serovars included in the panel [34], but another limitation of the MAT is the difficulty in setting a threshold of positivity which can range from 1:10 to 1:800, according to the authors and the location of the study [35–39]. In contrast, *in vitro* culture of *Leptospira* from kidney, blood or urine allows the serotyping of the isolated strains with certainty [40] but this method is lengthy, of low sensitivity and notably limited by contaminants outgrowth.

BARBADOS

Micromammals and mongooses

A study conducted during 1964–1965 [41] on *Rattus* sp. in Barbados showed that 33% (32/98) of *R. rattus* and 35% (48/138) of *R. norvegicus* were seropositive for leptospirosis by MAT. In 1986–1987 and 1994–1995, Levett *et al.* [42] isolated leptospires by culture of kidneys, urine or blood from 19% (12/63) and 16% (16/100) of rats, respectively. In these studies, the prevalence of renal infection was higher in *R. norvegicus* than in *R. rattus* [41, 42], with 27% (37/138) and 15% (15/98) testing positive, respectively [41]. Isolates identified in *Rattus* were serovars copenhageni (serogroup Icterohaemorrhagiae), arborea (Ballum) and bim (Autumnalis). *R. norvegicus* carried mostly leptospires from serogroup Icterohaemorrhagiae, whereas serogroup Autumnalis was mainly found in *R. rattus* [41].

In 2002, Matthias & Levett [21] showed that 28.2% (24/85) of mice (*Mus musculus*) and 40.7% (48/118) of mongooses (*Herpestes auropunctatus*) in Barbados had antibodies against *Leptospira* sp. In mice, the prevailing serovars assessed by serology (MAT) were arborea (Ballum) and bim (Autumnalis), whereas in mongooses the dominant serogroup was Autumnalis.

Table 1. *Presentation of the islands*

Island (country)	Location	Number of islands of the archipelago (number inhabited)	Main town, latitude, longitude (highest point)	Total terrestrial surface	Number of inhabitants (year of the census)	Density (inhab./km ²)	Incidence of human leptospirosis (number of cases per year per 100 000 inhabitants)*
Barbados (Barbados)	Caribbean Sea	1 (1)	Bridgetown, 13° 5' N, 59° 37' W (336 m)	430 km ²	281 968 (2008)	642	13.3 [11]
New Caledonia (France)	Southern Pacific Ocean	21 (7)	Nouméa, 22° 16' S, 166° 27' E (1629 m)	18 575 km ²	244 410 (2008)	13.16	22.85 [10]
Hawaii (USA)	Northern Pacific Ocean	122 (8 main islands)	Honolulu, 21° 19' N, 157° 50' W (4205 m)	16 760 km ²	1 211 537 (2000)	42.75	7.9 in Kauai [12] 5.9 in Hawaii [12] 0.3 in Oahu [12] 0.2 in Maui [12] 22.69 [10]
French Polynesia (France)	Southern Pacific Ocean	118 (shared out in 5 atolls)	Papeete, 17° 32' S, 149° 34' W (2241 m)	4167 km ²	259 706 (2007)	65	
La Réunion (France)	Indian Ocean	1 (1)	Saint-Denis, 20° 52' S, 55° 26' E (3071 m)	2512 km ²	810 000 (2009)	313	5.48 [10]
Mayotte (France)	Indian Ocean (Mozambique Channel)	4 (2)	Mamoudzou, 12° 46' S, 45° 13' E (660 m)	376 km ²	186 452 (2006)	499	11.44 [10]
Martinique (France)	Caribbean Sea	1 (1)	Fort-de-France, 14° 36' N, 61° 05' W (1397 m)	1128 km ²	397 732 (2006)	352.99	13.5 (Martinique + Guadeloupe) [10]
Guadeloupe (France)	Caribbean Sea	5 (5)	Basse-Terre, 16° 00' N, 61° 44' W (1467 m)	1434 km ²	400 736 (2006)	246	
Grenada (Grenada)	Caribbean Sea	10 (3)	St-George's, 12° 03' N, 61° 45' W (840 m)	344 km ²	110 000 (2005)	319.8	Not found
Trinidad and Tobago	Caribbean Sea	20 (2)	San Fernando, 10° 17' N, 61° 28' W (940 m)	6768 km ²	1 262 366 (2000)	246	0.08 [13]

* Registered cases only.

Table 2. *Insular repartition of the animal cited (class, order, family, Latin name and common name) and existence of studies on leptospirosis by species and island*

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
CLASS MAMMALIA										
ORDER ROSENTIA										
Family Muridae										
<i>Rattus rattus</i> (ship rat)	•	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19] *	• [18] *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22] *
<i>R. norvegicus</i> (Norway rat)	•	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19] *	• [18] *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22]
<i>R. exulans</i> (Pacific rat)	•	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19] *	• [18] *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22]
<i>Mus musculus</i> (domestic mouse)	•	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19] *	• [18] *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22]
Family Cricetidae										
<i>Oryzomys capito</i> (rice rat)					•					
<i>Rhipidomys couesi</i> (Coues's climbing mouse)					•					
<i>Necomys squamipes</i> (South American water rat)					•					
<i>Necomys urichi</i> (northern akodont)					•					
<i>Zygodontomys brevicauda</i> (short-tailed cane mouse)					•					
Family Heteromyidae										
<i>Heteromys anomalous</i> (Trinidad spiny pocket mouse)					•					
ORDER LARONIVORA										
Family Tenrecidae										
<i>Tenrec ecaudatus</i> (tailless tenrec)								• [22] *	• [22] *	• [22] *
ORDER DIDACTYLORHINA										
Family Didelphidae										
<i>Marmosa murina</i> (= <i>robisoni</i>) (mouse opossum)				• [30]	• [30] *					
<i>Marmosa fasciata</i> (fluffy mouse opossum)				• [31]	•					
<i>Didelphis marsupialis</i> (common opossum)		• [20, 22]		• [31]	• [18] *					
Family Caluromyidae										
<i>Caluromys phillander</i> (bare-tailed woolly opossum)					•					
ORDER CARNIVORA										
Family Canidae										
<i>Canis lupus</i> (dog)	•	•	• [22] *	•	•	• [21, 22] *	• [23]	• [22]	• [22] *	• [22] *
Family Felidae										
<i>Felis sylvestris</i> (cat)	•	•	• [22]	•	•	• [21, 22]	• [23]	• [22]	• [22]	• [22]
Family Herpestidae										
<i>Herpestes auropunctatus</i> (small Indian mongoose)	•	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [16] *	• [18] *		• [23]			• [22] *
Family Viverridae										
<i>Viverricula indica</i> (small Indian civet)										• [22] *

Table 2 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
Family Phocidae										
<i>Monachus schauinslandi</i> (Hawaiian monk seal)							•*			
ORDER ARTIODACTYLA										
Family Bovidae										
<i>Bos primigenius</i> (cattle)	•	• [22] *	• [22] *	•*	•*	• [21, 22] *	• [23] *	• [22] *	• [22] *	• [22] *
<i>Bubalus bubalis</i> (water buffalo)					•*					
<i>Capra aegagrus</i> (goat)	•*	• [22]	• [22] *	•*	•	• [21, 22]	• [23]	• [22]	• [22]	• [22] *
<i>Ovis orientalis</i> (sheep)	•*	• [22]	• [22]	•	•	• [21, 22]	• [23]	• [22]	• [22]	• [22]
Family Suidae										
<i>Sus scrofa</i> (pig)	•	• [22] *	• [22] *	•*	•*	• [21, 22] *	• [23]	• [22] *	• [22] *	• [22]
Family Cervidae										
<i>Cervus timorensis</i> (rusa deer)						• [21, 22] *			• [22]	
ORDER PERISSODACTYLA										
Family Equidae										
<i>Equus ferus</i> (horse)	•	• [22]	• [22] *	•	•*	• [21, 22] *	• [23]	• [22] *	• [22] *	• [22]
<i>Equus asinus</i> (ass)	•				•*	•*	•	• [22]	• [22]	
ORDER CARNIVORA										
Family Phyllostomidae										
<i>Anoura geoffroyi</i> (Geoffroy's tailless bat)				•*						
<i>Glossophaga longirostris</i> (Miller's long-tongued bat)				•*						
<i>Carollia perspicillata</i> (Seba's short-tailed bat)				•						
<i>Phyllostomus hastatus</i> (greater spear-nosed bat)					•*					
Family Molossidae										
<i>Molossus major</i>					•*					
Family Mormoopidae										
<i>Pteronotus davyi</i> (Davy's naked-backed bat)		•	• [15]		•*					•*
Family Pteropodidae										
<i>Pteropus seychellensis</i> (Seychelles flying fox)										
ORDER PRIMATES										
Family Cercopithecidae										
<i>Cercopithecus aethiops</i> (vervet monkey)	•*									
Family Cebidae										
<i>Cebus albifrons</i> (Trinidad white-fronted capuchin)					• [18] *					

Table 2 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
ORDER CINGLATA										
Family Dasypodidae										
<i>Dasypus novemcinctus</i> (nine-banded armadillo)			● [19]							
CLASS AMPHIBIA										
ORDER ANURA										
Family Bufonidae										
<i>Bufo marinus</i>	● [16] *	● [16]	● [16]	● [16] *	● [16] *		● [16]			
Family Leptodactylidae										
<i>Eleutherodactylus</i> sp.	● *	● [16]	● [16]	● [16]			● [16]			
Family Hylidae										
<i>Hyla minuta</i> (lesser tree frog)					● *					
CLASS REPTILIA										
ORDER SQUAMATA										
Family Teiidae										
<i>Tapinambis nigropunctatus</i> (gold tegu)				● [32]	● *					
<i>Ameciva ameiva</i> (giant ameiva)					● *					
Family Iguanidae										
<i>Iguana iguana</i> (common green iguana)			● [31]	● [31]	● *					
CLASS AVES										
ORDER GALLIFORMES										
Family Phasianidae										
<i>Gallus gallus</i> (fowl)	●	●	●	● *	● *	●	●	●	●	●
ORDER FALCONIFORMES										
Family Cathartidae										
<i>Coragyps atratus</i> (black vulture)					● *					

● Presence of the species on the island.

* Presence of data on leptospirosis for this species in the island concerned.

Primates

A survey conducted on a wild population of vervet monkeys *Chlorocebus (Cercopithecus) aethiops* revealed a seroprevalence to *Leptospira* of 29.9% (150/501). Serogroups identified were Ballum (61%), Icterohaemorrhagiae (16%), Autumnalis (15%), Pyrogenes, Panama, Pomona and Canicola (8% combined) [43].

Amphibians

Everard & Gravekamp [44–46] showed that amphibians were carriers of leptospires and two pathogenic strains were grown from kidneys of toads *Bufo marinus* (family Bufonidae) and frogs *Eleutherodactylus johnstonei* (family Leptodactylidae). The most prevalent strain in amphibians was *L. noguchii* serovar bajan (Australis) [45, 46], followed by serovar bim (Autumnalis) [44–46].

Domestic carnivores

A serological survey showed that 62% (48/78) of asymptomatic (stray or domestic) dogs had a positive MAT titre, with the dominant serogroup being Autumnalis (45%), followed by serogroups Icterohaemorrhagiae and Australis (16% each), then Pomona (13%). However, in dogs presenting clinical signs of leptospirosis, the prevailing serogroup was Icterohaemorrhagiae [47]. In this study, *Leptospira* grown from dogs' kidneys were principally serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae) and bim (Autumnalis) [47, 48].

Livestock

Levett *et al.* [49] showed that 4.3% of sheep (1/23) and 9.3% of goats (4/43) were seropositive for leptospirosis and antibodies against serogroup Cynopteri were identified in both species [49].

MARTINIQUE

Domestic carnivores

A serosurvey conducted in Martinique on dogs showed that the seroprevalence against leptospires was 76% (219/288) [50].

Livestock

Levett *et al.* [49] showed that 25.7% (45/175) of cattle were seropositive for leptospirosis and that Sejroe was

the most prevalent serogroup (44.4% of the positives), followed by Icterohaemorrhagiae (24.4%) and Autumnalis (17.7%) [49]. In pigs, the seroprevalence was 39% (110/282), with a predominance of serogroups Icterohaemorrhagiae and Sejroe, followed by Australis and Cynopteri [50].

GADELOUPE

Micromammals and wild carnivores (mongooses and racoons)

Michel [51] observed the renal carriage of the bacteria *Leptospira* in 16.6% (2/12), 36.8% (14/38) and 57.1% (8/14) of *R. norvegicus*, *R. rattus* and mice, respectively. MAT tests showed that seroprevalences in the racoon and the mongoose were similar with 48% (354/737) and 47% (8/17) positive, respectively [51, 52]. The serovar arborea (Ballum) was predominantly found in kidneys of mice [51], while serogroup Icterohaemorrhagiae was isolated from *R. rattus*, and serogroups Icterohaemorrhagiae, Sejroe and Australis were isolated from mongooses [51, 52].

Domestic carnivores

A recent MAT survey showed that 78.3% (83/106) of the Guadelupian dogs were seropositive against *Leptospira* [50].

Livestock

In 1973–1974, the dominant serogroup in cattle in Guadeloupe was Ballum (prevalence not shown) and the other serogroups found in cattle were Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Australis, Pomona, and Sejroe [53]. A serosurvey in 2002–2003 showed that 14% (29/205) of cattle were serologically positive against *Leptospira* [50].

Levett *et al.* [49] showed that 6.4% (13/203) of goats were seropositive for leptospirosis and Autumnalis, Cynopteri and Sejroe were identified as the infecting serogroups [49].

A serological study in 27 pig farms in the 1990s in Guadeloupe showed that 93% of swine were positive [54] but this seroprevalence fell to 35% (141/403) in 2002–2003 [50].

Equines

In 2002–2003, 61% (74/121) of horses were serologically positive against *Leptospira* [50].

Table 3. Main animal species studied for leptospirosis in the considered islands and results

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Rattus rattus</i>										
Seropositive	33% (32/98)	ND	36.8% (14/38)	ND	16% (5/32)	ND	19.7% (72/366)	ND	ND	0% (0/19)
Main serogroups found by MAT	ND		ND	ND	Ictero. Autumnalis Hebdomadi Javanica	ND				/
Renal carriers	15% (15/98)		ND	ND	ND	61.1% (11/18) (<i>R. rattus</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>R. exulans</i>)	43.7% (160/366)			ND
Serogroups isolated from kidney										
	Ictero. Ballum Autumnalis		Ictero.	Ictero. Ballum	Ictero. Ballum Louisiana	Ictero. Carnicola	Ictero. Ballum			ND
<i>Rattus norvegicus</i>										
Seropositive	35% (48/138)	ND	16.6% (2/12)	ND	43% (3/7)	See <i>R. rattus</i>	32.4% (165/510)	ND	ND	Absent
Main serogroups found by MAT	ND		ND	ND	Ictero. Autumnalis Hebdomadi Javanica					
Renal carriers	27% (37/138)		ND	ND	ND		60.2% (307/510)			
Serogroups isolated from kidney	Ictero. Ballum Autumnalis		ND	Ictero.	Ictero.		Ictero. Ballum Australis			
<i>Max musculus</i>										
Seropositive	28.2% (24/85)	ND	57.1% (8/14)	ND	29% (2/7)	ND	66.7% (26/39)	ND	ND	ND
Main serogroups found by MAT	Ballum Autumnalis		ND		Ictero.					
Renal carriers	ND		ND	ND	ND		79.5% (31/39)			
Serogroups isolated from kidney	ND		Ballum		ND		Ictero. Ballum			

Table 3 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Harposyllis auripunctatus</i>										
Seropositive	40.7% (48/118)	ND	47% (8/17)	35–36% (152/432–71/200)	48% (17/37)	Absent	28.6% (36/126)	Absent	Absent	Absent
Main serogroups found by MAT	Autumnalis	ND	ND	Ictero. (37.5%) Pomona (21.1%) Canicola (6.6%) 5.3%	Canicola Ictero. Pomona					
Renal carriers	ND	ND	ND	(10/190)	4.7% (5/106)		14.3% (18/126)			
Serogroups isolated from kidney	ND	ND	Ictero. Sejroe Australis	Ictero. Bataviae Tarassovi	Canicola		Ictero. Canicola Sejroe			
<i>Bos primigenius</i>										
Seropositive	ND	25.7% (45/175)	14% (29/205)	25% (80/324)	92% (24/26)	58.3% (204/350)	ND	15.5% (23/148) (dairy cattle)	29–32% (452/1582–337/1063)	85% (34/40)
Main serogroups found by MAT		Sejroe (44.4%) Ictero. (24.4%) Autumnalis (17.7%)	Ballum Ictero. Bataviae Australis Pomona Sejroe	Ictero. (28%) Autumnalis (24%) Hebdomadis/ Sejroe/Mini (12%)	Hebdomadis (24%)	Sejroe (59.3%) Tarassovi (19.6%) Pomona (7.8%)	Sejroe (43%) Bataviae Sejroe (14%) Ictero. (10%)	Sejroe (43%) Tarassovi (14%) Ictero. (10%)	Hebdomadis (25%) Sejroe (25%) Ictero. (12–13%) Pomona (11.7%) Autumnalis (12%) Autumnalis (8.8%) Ballum (5%) Australis (4.5%) Bataviae (4.5%) Grippotyphosa (4.5%) Canicola (0.5%)	Sejroe (29.3%) Canicola (23.5%) Grippotyphosa (23.5%) Ballum (11.7%) Pyogenes (8.8%) Australis (2.9%)
Renal carriers	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Serogroups isolated from kidney	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 3 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Capra aegagrus</i>										
Seropositive	9.3% (4/43)	ND	6.4% (13/203)	25% (11/44)	ND	ND	ND	ND	ND	70% (7/10)
Main serogroups found by MAT	Cynopteri		Autumnalis Cynopteri Sejroe	Pyrogenes						Ictero. (28.6%) Sejroe (28.6%) Carnicola (14.3%) Ballum (14.3%) Grippocephala (14.3%) ND ND
Renal carriers	ND									
Serogroups isolated from kidney	ND	ND	ND	ND						
<i>Sus scrofa</i>										
Seropositive	ND	39% (110/282)	35% (141/403)	35% (45/130)	52% (64/122)	58.3% (21/36)	ND	32-39% (37/115-140/360)	5% (3/57)	ND
Main serogroups found by MAT		Ictero. Sejroe Australis Cynopteri	ND	Autumnalis (35%) Ictero. (32%)	Ictero. (56%) Autumnalis (29%)	Pomona Ictero.		Ictero. (22.6%) Pomona (18%) Australis (16.7%) Carnicola (10.8%) Cynopteri (9.9%) Autumnalis (7.1%)	Hebdomadis Autumnalis	
Renal carriers	ND	ND	ND	ND	ND	ND			ND	
Serogroups isolated from kidney	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	

Table 3 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Equus ferus</i>										
Seropositive	ND	ND	61% (74/121)	ND	76% (66/87) (horses and donkeys)	94.4% (17/18)	ND	100% (5/5)	69-71% (100/145- 121/171)	ND
Main serogroups found by MAT			ND		Panama (23%) Ictero. (15%) Canicola (9%) Hebdomadis (9%)	Ictero. Pyrogenes Harrsbridge		Pomona Australis Ictero.	Autumnalis (30-34%) Ictero. (14-18%) Australis Ballum	
Renal carriers					ND	ND		ND	ND	
Serogroups isolated from kidney			ND		ND	ND		ND	ND	
<i>Canis lupus</i>										
Seropositive	62% (48/78)	76% (219/288)	78.3% (83/106)	ND	55% (stray dogs)	59.25% (48/81)	ND	ND	40% (58/ 142-60/150) (stray dogs) Canicola (69%) Ictero. (16-26%)	ND
Main serogroups found by MAT	Autumnalis (45%) Ictero. (16%) Australis (16%) Pomona (13%)	ND	ND		Canicola Ictero. Hebdomadis	Ictero. Canicola				Ictero.
Renal carriers		ND	ND		20% (10/50) Canicola Ictero. Hebdomadis Autumnalis Ballum	ND			ND	ND
Serogroups isolated from kidney	Copenhageni Bim	ND	ND		ND	ND			ND	ND

ND, No data.
Absent, Species not present on this island.

Table 4. Relation between serovars cited in the text and serogroups (from [2])

Serovars	Serogroups
arborea, ballum	Ballum
autumnalis, bim, bragg	Autumnalis
icterohaemorrhagiae, copenhageni, mankarso, RGA	Icterohaemorrhagiae
australis, bajan, bangkok, bratislava, peruviana	Australis
sejroe, hardjo, wolffi	Sejroe
bataviae	Bataviae
pomona	Pomona
tarassovi, atchafalaya, navet	Tarassovi
canicola, portlandvere	Canicola
cynopteri	Cynopteri
georgia	Hebdomadis
lanka	Louisiana
brasiliensis	Bataviae
grippotyphosa	Grippotyphosa

GRENADA

Micromammals and mongooses

Utilizing kidney culture, Everard *et al.* [19] showed the renal carriage of serovar copenhageni (Icterohaemorrhagiae) in *R. norvegicus*, while serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae) and ballum (Ballum) were cultured from kidneys of *R. rattus*.

In 1971–1972 and in 1983, two serosurveys showed that 35% (152/432) [13] to 36% (71/200) [19] of the Grenadian mongooses were seropositive by MAT and three serogroups were identified: Icterohaemorrhagiae was the dominant serogroup [13, 19] representing 37.5% (57/152) of the positives, then Pomona in 21.1% (32/152) of the positives and Canicola in 6.6% (10/152) of the positives [13]. Leptospire were isolated from kidneys in 5.3% (10/190) of the mongooses and serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae), brasiliensis (Bataviae) and atchafalaya (Tarassovi) were identified [19].

Bats

In bats of the family Phyllostomidae, 8% (4/52) of *Glossophaga* sp. were found positive for leptospirosis, while 21% (13/61) of positives were found in *Anoura* sp. (13/61) [19]. Of the 121 cultures of bat kidneys none gave a positive result [19].

Amphibians

Everard *et al.* [19] reported 15% (10/66) seropositive in the toad *B. marinus*. Serovars navet (Tarassovi) and peruviana (Australis) were cultured from kidneys in two of these animals.

Livestock

Everard *et al.* [55] found 25% (80/324) of cattle to be seropositive for leptospirosis and Icterohaemorrhagiae was the dominant serogroup (28%), followed by Autumnalis (24%) and Hebdomadis and related serogroups Sejroe and Mini (12%) [55]. They also reported that 35% (45/130) of Grenadian pigs tested were seropositive, of which 35% were against serogroup Autumnalis and 32% against Icterohaemorrhagiae [55]. In sheep, 17% (18/108) were seropositive and Autumnalis was the predominant serogroup (33% of the positive sera). In goats, seroprevalence of leptospirosis was of 25% (11/44) and the dominating serogroup was Pyrogenes [55].

Chickens

Everard *et al.* [55] reported that 11% (19/175) of chickens were seropositive by MAT and antibodies found were mainly against serogroups Hebdomadis (42% of the positives) and Shermani (32%).

TRINIDAD

Micromammals and mongooses

Everard *et al.* [19] showed that 16% (5/32) of *R. rattus* were seropositive by MAT, while 43% (3/7) of *R. norvegicus* and 29% (2/7) of mice were seropositive. In *Rattus* sp. antibodies detected were directed against serogroups Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Hebdomadis and Javanica, while in mice, these authors found antibodies against Icterohaemorrhagiae only. Serovar copenhageni (Icterohaemorrhagiae) was isolated from the kidney of *R. norvegicus* and *R. rattus*, whereas serovars ballum (Ballum) and lanka (Louisiana) were isolated from kidneys of *R. rattus* only [19]. Everard *et al.* also showed that in the family Muridae, 24% (4/17) of the scaly-footed water rat *Nectomys squamipes* and 29% (2/7) of the rice rat *Oryzomys capito* were serologically positive. Twenty-five per cent (1/4) of the Trinidad spiny pocket mice *Heteromys anomalus* (family Heteromyidae) tested were positive. No antibodies

against leptospires were found in Coues's climbing mouse *Rhipidomys couesi* (family Cricetidae) (0/2), nor the northern grass mouse *Necomys urichi* (family Cricetidae) (0/1) or the cane mouse *Zygodontomys brevicauda* (family Muridae) (0/1) [19].

In 1976, the proportion of seropositive Trinidadian mongooses ranged between 33.3% and 51.1% [13], whereas in 1983, 48% (17/37) of the mongooses sampled were seropositive [19]. In both studies, MAT results showed that serogroup Canicola predominated in this species [13, 19], but Icterohaemorrhagiae and Pomona were also encountered [13]. Canicola strains were isolated from the kidneys of mongooses [13, 19], with an infectivity rate of 4.7% (5/106) [13].

Bats

On the eight species of bats caught by Everard *et al.* [19], four presented a seropositive result with the MAT method: *Carollia perspicillata* (family Phyllostomidae), with 11% (2/19) seropositive; *Phyllostomus hastatus* (family Phyllostomidae), with 27% (13/48) seropositive; *Pteronotus davyi* (family Mormoopidae), with 13% (2/15) seropositive and *Molossus major* (family Molossidae) with 25% (5/20) seropositive. Serogroups identified in bats were: Autumnalis, Hebdomadis, Javanica, Panama, Pyrogenes, Tarassovi, and Cynopteri [19].

Didelphimorphia

Everard *et al.* [19] showed that in the order Didelphimorphia, 5% (1/22) of the black-eared opossums *Didelphis marsupialis* (family Didelphidae) and 4% (5/73) of the murine opossums *Marmosa mitis* (= *M. robinsoni*, family Didelphidae) were found seropositive. Seven per cent (1/14) of the white-eared opossums *Caluromys philander* (family Caluromyidae) were seropositive. Serovars lanka (Louisiana) and ballum (Ballum) were cultured from kidneys of *M. mitis* and serovar ballum (Ballum) was isolated from *C. philander*. Serological research of leptospiral antibodies was negative in *Marmosa fuscata* (*fuscatus*) but renal cultures revealed the presence of serovar lanka (Louisiana) in this species [19].

Primates

Leptospiral antibodies were researched in *Cebus* sp. (family Cebidae) but revealed as negative [19].

Squamates and amphibians

Forty-two per cent (5/12) of the gold tegus *Tupinambis nigropunctatus* (order Squamata, family Teiidae) sampled were found positive by MAT, while all the lizards *Amelva amelva* (family Teiidae) (4/4) and all the iguanas *Iguana iguana* (family Iguanidae) (1/1) caught were seropositive [19]. Everard *et al.* [19] showed that 25% (20/80) of the marine toads *B. marinus* were seropositive but none (0/2) of the lesser tree frogs *Hyla minuta* (order Anura, family Hylidae) tested positive. Serovar autumnalis (Autumnalis) was isolated from the marine toad [19].

Domestic carnivores

In 1979, serological data reported that at least 55% of the stray dogs had been exposed to leptospires as opposed to only 12.5% of the cats. Agglutinins against serogroups Canicola, Icterohaemorrhagiae and Hebdomadis were found most frequently in these species [56]. Twenty per cent (10/50) of the sampled dogs carried leptospires in their kidneys [56]. Serovars isolated in dogs were portlandvere (Canicola), canicola (Canicola), copenhageni (Icterohaemorrhagiae) and georgia (Hebdomadis), whereas serovar canicola was isolated from one cat. A seroepidemiological survey was conducted in 2005 in different populations of Trinidadian dogs [57]: among house dogs 7.7% (5/65) of the non-vaccinated animals were seropositive. The prevalence was the highest among hunting dogs with 25.5% (12/47) positive, while 20.4% (10/49) and 4.4% (5/113) of the farm and stray dogs, respectively, were seropositive. In the population of dogs suspected of leptospirosis, 48% (24/50) were seropositive. Nine serovars of *L. interrogans* were identified in this species. The most prevalent serovar was mankarso (Icterohaemorrhagiae), in 47.5% of the seropositive dogs (29/61). The other serovars were icterohaemorrhagiae RGA (Icterohaemorrhagiae 32.8%, 20/61), autumnalis (Autumnalis 41%, 25/61), copenhageni (Icterohaemorrhagiae 16.4%, 10/61), bratislava (Australis 13.1%, 8/61), georgia (Hebdomadis), ballum (Ballum) and wolffi (Sejroe) (1.6% each, 1/61) [57].

Livestock

In 1985, MAT results reported that 92% (24/26) of cattle were seropositive with serogroup Hebdomadis predominating [55]. All of the ten 'bufflypso' (water buffaloes, *Bubalus bubalis*) tested were positive and

the prevailing serogroup in these animals was *Grippytyphosa* [55]. In 2009, a larger study reported that 14.6% (33/226) of the water buffaloes were seropositive [58].

Among swine, it was shown that 52% (64/122) of the sampled animals were serologically positive with 56% and 29% of those seropositive having antibodies against serogroups *Icterohaemorrhagiae* and *Autumnalis*, respectively [55].

Equines

MAT results showed that 76% (66/87) of horses and donkeys were seropositive [55]. Panama was the most frequently reported serogroup (23% of positive animals), followed by *Icterohaemorrhagiae* (15%), *Canicola* and *Hebdomadis* (9% each) [55].

Poultry and wild birds

Everard *et al.* [55] showed that 11% (16/144) of the chickens tested had a positive serological reaction against *Leptospira*. Fifty per cent of the reactions were against serogroup *Shermani*, while 25% were against serogroup *Hebdomadis*. Eight ducks and geese were also tested but were negative. No leptospiral antibodies were found in the American black vulture *Coragyps atratus* [55].

NEW CALEDONIA

Micromammals

In 1985–1986, a study based on culture showed that 61.1% (11/18) of rats (*R. rattus*, *R. norvegicus*, *R. exulans*) excreted leptospires in their urine [59]. A complementary study identified the leptospires shed in urine of rats as belonging to serogroups *Icterohaemorrhagiae* and *Canicola* [60].

Domestic carnivores

In 1985–1986, Brethes *et al.* [60] reported that 59.25% (48/81) of canids in New Caledonia were seropositive, of which 39.6% (19/48) had antibodies against serogroup *Icterohaemorrhagiae*. In the particular area of Bourail (a 'hot-spot' of human leptospirosis in New Caledonia), 63% (29/46) of dogs were seropositive, of which 55% (16/29) were against *Icterohaemorrhagiae*. Predominance of serogroup *Icterohaemorrhagiae* in canids was confirmed in 1999 by the Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire (LTDV) whose results reported serological evidence

of a high circulation of serogroup *Canicola* in dogs [61].

Livestock

All cattle sampled (15 animals) in the area of Bourail in 1985–1986 were positive by MAT [60]. A subsequent survey in 1990 on the entire New Caledonian cattle assessed the seroprevalence at 58.3% (204/350), with 74.6% (85/114) of the surveyed herds having at least one positive animal [62]. Serogroups *Sejroe*, *Tarassovi* and *Pomona* were circulating in New Caledonian cattle [60, 62], with a prevalence of 59.3%, 19.6% and 7.8% among the positive animals, respectively [62]. In 2007, the annual report of the LTDV confirmed the predominance of serovars *hardjo* (*Sejroe*) and *sejroe* (*Sejroe*) in cattle [10].

In 1985–1986, 58.3% (21/36) of pigs were found to be seropositive for leptospirosis. By MAT, sera reacted principally against serogroup *Pomona* and secondly against *Icterohaemorrhagiae* [59].

Antibodies against serovar *hardjo* (*Sejroe*) were found in the *Rusa* deer [60].

Equines

In 1983, MAT results showed that the dominant serogroups in horses in New Caledonia were *Canicola* and *Pomona* [63]. In 1986, the dominant serogroup was *Icterohaemorrhagiae*: 17/18 of the horses sampled in the area of Bourail were seropositive, of which nine were against *Icterohaemorrhagiae* [60]. *Icterohaemorrhagiae* was still prevailing in horses in 1996 [64]. However, since 1996, inclusion of serogroups *Pyrogenes* and *Hurtsbridge* in the MAT panel of strains demonstrated the high circulation of these serogroups in positive horses, with a frequency of 29.3% and 18.8%, respectively, in 1996 [64]; 18.7% and 43.2%, respectively, in 1998 [65]; and 52.3% and 32.1%, respectively, in 1999 [61].

A serological survey conducted on the donkeys of Maré (Loyalty Islands) in 1999 proved that 97% (38/39) of the sampled animals had antibodies against *Leptospira*. The dominant serogroups were *Hurtsbridge* and *Pyrogenes* [61].

HAWAII

Micromammals and mongooses

In the 1950s and 1960s, the study of Wallace *et al.* [66] on Hawaiian rats *R. norvegicus*, *R. rattus*, *R. hawaiiensis* (= *R. exulans*), mice and mongooses

reported that 45% (558/1238) of these mammals had antibodies against *Leptospira*. A survey conducted between 1959 and 1961 on 1281 mammals (same species as cited above) [67] showed that mice and *R. norvegicus* populations were highly infected, with respectively 66.7% (26/39) and 32.4% (165/510) seropositive by MAT and 79.5% (31/39) and 60.2% (307/510) renal carriers. They were followed by the mongoose with 28.6% (36/126) seropositive, and 14.3% (18/126) renal carriers. The serological prevalence in *R. rattus* was lower with 19.7% (72/366) seropositive contrasting with the high rate of renal carriage (43.7%, 160/366) in this species [67]. Cultures of kidney tissues proved the renal carriage of serovar icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) in all the species [66, 67]. Serovar ballum (Ballum) was only recovered in *R. rattus* [66]. One isolate of the serogroup Australis was obtained in *R. norvegicus*, while serogroups Canicola and Sejroe were isolated from the mongoose only [67]. Another survey was conducted in Hawaii between 1969 and 1973 on 2982 animals of the same species [68] and the following seroprevalences were found: 34.0% (419/1234) positive in *R. rattus*, 61.4% (137/223) in *R. norvegicus*, 17.8% (166/932) in *R. exulans*, 43.2% (41/95) in *M. musculus* and 28.8% (136/473) in *H. auroreus* [68]. Cultures of kidneys showed that serogroup icterohaemorrhagiae was predominant in *R. norvegicus* (91.4% of positives, 85/93), while 58.7% (24/41) of the identified cultures recovered from mice were from serogroup Ballum and 59.7% (43/72) of those recovered from mongooses were from serogroup Sejroe. Serogroups Icterohaemorrhagiae and Ballum were isolated from all rat species and mice, but not from mongooses, while Sejroe was isolated only from mongooses [68].

Marine mammals

A serological study on the endemic monk seals of Hawaii *Monachus schauinslandi* (order Carnivora, family Phocidae) showed that leptospirosis was circulating in this population and that monk seals had positive titres against serovars bratislava (Australis), hardjo (Sejroe), icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) and pomona (Pomona) [69].

Livestock

Serovars hardjo (Sejroe) and bataviae (Bataviae) were identified by MAT in cattle on Kauai island in 1987 [70].

FRENCH POLYNESIA

Livestock

In 1988, Raust [71] published the results of a serological survey showing that 15.5% (23/148) of dairy cattle were seropositive and that the dominant serovar was hardjo (Sejroe) in 43% of those positive, followed by serovar tarassovi (Tarassovi) in 14% and serovar sejroe (Sejroe) in 10%. A health control conducted in 1997 in cattle confirmed the results of 1988 [72].

In 1988, 32% (37/115) [71] to 39% (140/360) [65] of pigs were seropositive by MAT. Both studies reported icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) as the most prevalent serovar in this species (22.6% of positive pigs for the former, 96% for the latter). The first study also identified pomona (Pomona, 18%), bratislava (Australis, 16.7%), canicola (Canicola, 10.8%), cynopteri (Cynopteri, 9.9%) and autumnalis (Autumnalis, 7.1%) as circulating serovars in pigs [71].

Equines

Only five horses were tested during the survey of Raust in 1988 [71], and all were seropositive. Serovars pomona (Pomona), australis (Australis) and icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) were identified in this species.

LA RÉUNION

Micromammals

In 2007, a serological survey on tenrecs *Tenrec ecaudatus* (order Lipotyphla, family Tenrecidae) showed a seroprevalence of 92% (34/37) in this species with all sera predominantly reacting against serogroup Icterohaemorrhagiae [73].

Domestic carnivores

Two serosurveys conducted in a dog pound in 1977–1979 [74] and 1978–1983 [75] showed that 40% (58/142 and 60/150, respectively) of the stray dogs were seropositive by MAT. In the former study, serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae were found in 69% (40/58) and 26% (15/58), respectively, of the seropositive dogs [74] while in the latter study 16% of those seropositive had antibodies against Icterohaemorrhagiae [75].

Livestock

In 1978–1979, two simultaneous serological studies showed similar results with 29% (452/1582) [76] and 32% (337/1063) [74] of cattle having a positive serological titre. Serogroups *Hebdomadis* and *Sejroe* each represented 25% of the seropositive reactions [74, 76], serogroup *Icterohaemorrhagiae* accounted for 12–13% [75, 77], *Pomona* 12% [76], *Autumnalis* 10–12% [74, 76], *Ballum* 5% [76], *Australis*, *Bataviae* and *Grippytyphosa* 4.5% each, and *Canicola* 0.5% [76]. In La Réunion, serogroups *Sejroe* and *Hebdomadis* were recognized as a major cause of abortion in dairy cattle [77].

A sampling conducted in 1979 at a slaughter-house revealed a limited circulation of leptospires in swine, with 5% (3/57) of pigs seropositive and circulation of serogroups *Autumnalis* and *Hebdomadis* [74]. Currently, field data indicate a high seroprevalence rate in reproduction swine: a serological follow-up of 13 pig farms between 2001 and 2008 showed that each year 6–29% of the tested sera were positive (Dr P. André, personal communication).

Equines

At the end of the 1970s, there were four riding schools in La Réunion, accounting for about 150 horses. In this equine population, 10–20 cases of leptospirosis occurred throughout the year [77]. In 1979, two serological surveys [74, 76] revealed that 69% (100/145) to 71% (121/171) of the horses were seropositive. Eleven different serogroups were serologically identified in horses and the predominant serogroup was *Autumnalis* (30–34% of positive reactions), while *Icterohaemorrhagiae* was found in 14–18% of positive animals [74, 76]. In 1983, Mollaret *et al.* [75] confirmed that 12% of horses were serologically reactive against serogroup *Icterohaemorrhagiae*. Moutou [74] pointed out that the prevailing serogroup differed among the riding school of origin: *Icterohaemorrhagiae* in the riding school of St-Denis, *Australis* in the riding schools of St-Gilles and Tampon, *Ballum* in horses of Bras Panon. Nevertheless, in 1990, following a clinical outbreak of leptospirosis in the riding school of Tampon, 22 horses were tested. All were seropositive for *Icterohaemorrhagiae* (Dr A. Michault, personal communication). Thus if leptospirosis is highly prevalent in horses in La Réunion without systematic clinical expression of the disease, serogroup *Icterohaemorrhagiae* could be responsible for clinical outbreaks.

MAYOTTE

Micromammals and wild fauna

The 19 rats sampled in 1991 were all seronegative by MAT [78].

In the same year, the circulation of serovar *hardjo* (*Sejroe*) was shown in two out of ten tenrecs *T. ecaudatus* and in the only fruit bat *Pteropus seychellensis* (order Chiroptera, family Pteropodidae) caught. Antibodies against serogroup *Pyrogenes* and serovar *wolffi* (*Sejroe*) were also found in the tenrec, while antibodies against serovar *icterohaemorrhagiae* (*Icterohaemorrhagiae*) were found in small Indian civets *Viverricula indica* (order Carnivora, family Viverridae) [78].

Domestic carnivores

MAT results showed the circulation of serovar *icterohaemorrhagiae* (*Icterohaemorrhagiae*) in dogs [78].

Livestock

At the beginning of the 1990s, zebus, goats and dogs were highly infected, with 85% (34/40), 70% (7/10) and 83% (5/6) seropositive, respectively. In zebus, serovars identified by MAT were *canicola* (*Canicola*), *grippytyphosa* (*Grippytyphosa*), *sejroe* (*Sejroe*), each accounting for 23.5% of the seropositives, then *ballum* (*Ballum*, 11.7%), *Pyrogenes* (8.8%), *wolffi* (*Sejroe*, 5.8%) and *australis* (*Australis*, 2.9%). In goats, serovars were *icterohaemorrhagiae*, *wolffi* (each accounting for 28.6% of seropositives), *canicola*, *ballum* and *grippytyphosa* (14.3% each) [78].

DISCUSSION

Origin of the serovars

Introduction of animal species in a region induces introduction of simultaneous pathogens. So, originally, the presence of leptospiral serovars circulating on each island was linked with the history of the human colonization and the shipping importations of animals by the Europeans [20, 28, 79]. Nevertheless, serovars circulating on a colonized island are different from those of the colonizing country. Even if no study has compared mainland and tropical islands, we know that serovars carried by rats, mice and hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in New Zealand are not the same as those carried by the same species in

Great Britain, the country from where they were imported during colonization [80]. Thus, the few serogroups of leptospires circulating in animals on an island are specific to the animals which have colonized the island and could maintain themselves in this typical environment. Serovars present on tropical islands are generally circulating worldwide but each island represents a unique ecosystem, the limited panel of serovars found in each insular area is absolutely island specific.

The case of vaccinated animals

The most commercially available vaccines against leptospirosis are for dogs and are directed against serogroups Icterohaemorrhagiae and Canicola. Consequently, the presence of seropositive domestic dogs [50] and the presence of both these serogroups in high proportions in populations of healthy dogs [60, 61] could be partly explained by the vaccination measures currently practised in the majority of the presented islands. Nevertheless, a study in Trinidad showed that vaccination did not have any significant effect on *Leptospira* infection as similar prevalence of infections were detected for both vaccinated (5.3%) and non-vaccinated dogs (7.7%) [57]. Moreover, Hathaway *et al.* [80] showed that agglutinins induced by the vaccine disappear within weeks of administration [81]. Consequently, the seropositive dogs detected in the different studies were essentially due to exposure to field serovars of *Leptospira* sp.

Carrier state and immune response

In Hawaii the rate of renal infection in *R. norvegicus*, *R. rattus* and *M. musculus* is significantly higher than the serological prevalence in each species [67]. The same observation was reported in the rodent population of Terceira Island (Azores) [9] and in *R. norvegicus* caught in Brazil [7, 38]. Duration of immunity is not known in field rats, but after infection in carrier animals, leptospires are subsequently cleared from all organs except the renal tubules [82]. Thus, in the absence of re-infection, carrier animals may be serologically negative, thus the carrier state may not be detected in MAT-positive animals. In contrast, other studies showed that the serological prevalence in rats is higher than the renal carriage [8]. Consequently, serology is often not clear, as MAT-negative bacteriologically proved carriers may be encountered [2].

Diversity of hosts and serovars in insular areas

In insular areas of volcanic origin like La Réunion, Mayotte, Hawaii, Martinique, Guadeloupe and French Polynesia, the mammalian diversity is generally poor and leptospires have a limited choice in mammalian hosts compared to the larger choice offered by continental countries like Guyana [83], Peru [84], Brazil [85], or larger islands, e.g. New Zealand [80] or Australia [86]. In consequence, bacteria concentrate themselves in abundant species, susceptible but generally non-sensitive, living most frequently in an anthropic environment, and which are perfect to play the role of reservoir and spreader of bacteria. On these islands, this role is played most frequently by alien species, e.g. rats and mice, or even mongooses and dogs.

Almost all knowledge on leptospirosis is related to infection in mammals but the finding of *Leptospira* in amphibians and reptiles [45, 46], which live in moist or wet environments, and birds [55], leads to questions about the role of these species, if any, in the carriage and maintenance of foci of leptospirosis.

Comparison with mainland

The seroprevalence of leptospirosis in animals seems to be higher in small islands than in mainland or larger islands but the number of circulating serovars is lower. In fact, the diversity of serovars in a region may be correlated on the one hand directly with the faunistic diversity of the area (number of potential hosts) and on the other with its environmental diversity [8]. For example, in Australia, which can be considered as the nearest 'mainland' from New Caledonia, the prevalence of leptospirosis in the dog population is 1.9% (18/956) [87], which is markedly inferior to the prevalence in New Caledonian dogs (59.25%) [60]. Nevertheless, although only two serovars are described in the New Caledonian canids [60, 61], 11 are found in Australian dogs [87]. An other example can be found in Trinidad which has a greater mammal species diversity (about 100 mammalian species) than the neighbouring island of Grenada (15 mammalian species): 80 isolates of *L. interrogans* were reported in Trinidad to infect humans, domestic and wild animals, and only 20 were reported in Grenada [88]. The hypothesis is reinforced by the situation in the temperate Azorean islands (North Atlantic ocean) where three serovars are described in the four rodents and insectivorous

mammal species present, while six serovars are counted among the 21 micromammals in Portugal [51, 89].

Adaptation of the serovars to insular ecosystems

When a serovar is introduced within a new ecosystem, it finds an ecological niche that may be different from the one it uses in its native environment. Indeed, one animal species, living in two different countries/islands within two different ecosystems, may offer two distinct ecological niches for leptospires [80, 90]. Generally, in a geographical region an equilibrium is established in which there is an 'adaptation' of a serogroup to a reservoir species [4, 74]. Thus, the Indian mongoose (*H. auropunctatus*) is considered as a reservoir for serogroups Sejroe, Icterohaemorrhagiae and Canicola in Hawaii [67, 68], serogroup Sejroe in Oahu island [91], serogroups Icterohaemorrhagiae, Sejroe and Australis in Guadeloupe [51, 52], serogroup Canicola in Trinidad [13, 19] and serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae), atchafalaya (Tarassovi) and brasiliensis (Bataviae) in Grenada [19]. Moreover, in La Réunion, Moutou [74] reported that the dominant serogroup identified by serology in horses differed according to the riding school in which the animals lived, i.e. according to the geographical zone of the island.

Lastly, it should be noted that phenomena of speciation by adaptation to a particular host in a small biotope can lead to the appearance of new serovars, e.g. serovar bim (Autumnalis) in dogs on Barbados [48] or atchafalaya (Tarassovi) in Grenadian mongooses [19], or even serovar lanka (Louisiana) in Trinidad [19].

Evolution of seroprevalence

Few studies report a follow-up of the seroprevalence of leptospirosis in animal species. A survey was conducted between 1959 and 1961 on five species of wild mammals in Hawaii [67] and another survey on the same species was conducted between 1969 and 1973 [68] (see earlier results); comparison between the two studies shows that (i) serogroups of *Leptospira* sp. isolated by culture in each animal species were the same but the relative distribution of the serovars per species was different and (ii) the serogroup Sejroe was emergent in the mongoose. Furthermore, the respective densities of the rodents and mongooses have

changed in Hawaii, with an increase of the populations of *R. rattus*, *R. exulans* and mongooses, while the populations of *R. norvegicus* and mice decreased. In consequence, although in the 1960s *R. norvegicus* and the mouse were the main reservoirs of leptospires in Hawaii, in 1973 *R. rattus* represented the main bacterial reservoir. Therefore, the epidemiology of the disease had changed in Hawaii, switching from a peridomestic animal reservoir (*R. norvegicus* and mouse) to a more rural reservoir (*R. rattus* and mongoose) [68].

Different examples show that the seroprevalence of leptospirosis in one species seems to be quite stable over time. In 1971–1972 and in 1983, two serosurveys proved that the seroprevalence assessed by MAT in mongooses in Grenada did not evolve over 10 years with a prevalence of 35% [13] and 36%, respectively [19]. Moreover, prevalence of antibodies did not change much in Trinidadian mongooses over 6 years, with 33.3–51.1% seropositive in 1976 [13], whereas in 1983, 48% of the mongooses sampled were seropositive [19]. In La Réunion two serosurveys conducted in the same dog pound at two distinct periods (1977–1979 [74] and 1978–1983 [75]) showed that 40% (58/142 and 60/150, respectively) of the stray dogs were seropositive by MAT. Similarly for French Polynesia the seroprevalence in cattle did not evolve between 1988 and 1997 [65].

Nevertheless, an exception can be found in the population of pigs in La Réunion in which the seroprevalence seemed to increase significantly over 30 years going from 5% of pigs seropositive in 1979 to 6–29% at 7 years follow-up conducted between 2001 and 2008. Three hypothesis can be put forward: (i) the survey of Moutou [74] underestimated the prevalence of the disease in swine, either because of a too small sample size or because the animals sampled were too young; (ii) the disease has greatly evolved in La Réunion, with a 'burst' occurring during the last 30 years; (iii) changes in the methods of farming, going from small family pig farms to battery industrial breeding farms could have induced an evolution in the prevalence of leptospirosis in pigs. Thus, higher animal density could favour the maintenance and transmission of the disease inside farms, and the gathering of fattening animals born in different reproductive farms, or in a growing farm could favour the spread of the disease between sites. Moreover the seroprevalence and consequences of the disease are different when considering breeding sows or grower animals [92].

Meteorological factors

In tropical regions, high rainfall is the main climatic factor of maintenance of leptospires in the environment and of their transmission to exposed animals and humans [93, 94]. A survey conducted in Hawaii between 1969 and 1973 showed that the seroprevalence rates in rodents and mongooses were higher on the Eastern coast (where rainfall is high) than on the Western part of the island [68]. In North America, a statistical positive correlation was also demonstrated between prevalence of infection in dogs and rainfall [95]. Moreover, in 2002–2003 and 2003–2004 the Caribbean region had two successive years of the El Niño phenomenon, which resulted in an increase in rainfall and probably in a proliferation of rodents which modified the epidemiology of human leptospirosis in Guadeloupe. In consequence, not only was there an increase in the total number of human cases observed in this island, but also the number of cases due to serogroup Ballum, a mouse-associated serogroup [8, 9] increased [96].

Nevertheless, cyclones do not appear to be linked with an increase in the number of human cases in La Réunion (Dr A. Michault, personal communication), nor in Guadeloupe [96]. It is likely that these intense climatic phenomena are responsible for the leaching of the environmental reservoirs and the destruction of the habitats of the micromammals considered as reservoirs [96].

CONCLUSION

This paper reviews the current knowledge on animal leptospirosis in small tropical islands and shows that the specificity of the host–serovar relation is greatly dependent of a specific insular ecosystem. However, the interpretation of the serological results and comparison between islands might be hazardous for two main reasons: (i) data are mainly stemmed from sero-epidemiological surveys that include a variable number of species and individuals, and (ii) methods of analysis and thresholds of positivity differ between studies.

Nonetheless, leptospirosis appears endemic in the majority of the animal species. If the status of domestic or peri-domestic (rats, mongooses, mice) animals against leptospirosis has been well studied in insular areas, the wild fauna has been investigated less so. The interest of the scientific community in animal leptospirosis in these regions is modest thus far, and

available data are often poor, mainly due to the fact that research is concentrated on the human disease. This paper stresses the need for more research in this field and highlights that studies on fauna have to be done at the island scale. Identification of the prevailing serovars and of their animal reservoirs is essential to understand the particular epidemiology of leptospirosis on each island and advise measures of prevention for humans. Furthermore, the economic cost of human and animal leptospirosis in these islands is not negligible [97]. Because molecular tools are more powerful than serology and because they allow the establishment of stronger epidemiological links between strains circulating in animals and those inducing disease in humans, the use of genotyping techniques needs to be incorporated into epidemiological studies of *Leptospira* sp. in insular areas in order to generate more meaningful and translational data.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Pierre Aubry (Emeritus Professor at the Medicine Faculty of Antananarivo, Madagascar), Margarida Collares-Pereira (Institute of Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon, Portugal) and Cyrille Goarant (Pasteur Institute, New Caledonia) for providing several cited papers. We thank François Moutou (AFSSA, Paris), Michel Pascal (INRA, Rennes), Pascale Bourhy (Centre National de Références des Leptospiroses, Pasteur Institute, Paris), Vincent Porphyre (CIRAD, La Réunion) and Paul André (Veterinarian, La Réunion) for their scientific advice, and Hélène Delatte (CIRAD, La Réunion) for support.

Political and population information on countries has been extracted from Wikipedia via the internet and is not necessarily accurate.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Everard COR. Leptospirosis in the Caribbean. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1981; **15**: 397–399.
2. Faine S, *et al.* *Leptospira and leptospirosis*, 2nd edn. Melbourne, Australia: MediSci, 1999, p. 296.
3. Morey RE, *et al.* Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; **44**: 3510–3516.

4. Adler B, de la Peña Motezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2010; **140**: 287–296.
5. Bahaman AR, Ibrahim AL. A short review of animal leptospirosis with special reference to Malaysia. *Tropical Biomedicine* 1987; **4**: 93–99.
6. Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14**: 296–326.
7. Pereira MM, Andrade J. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospires and specific antibodies in rodents. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; **82**: 768–770.
8. Vanasco NB, et al. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; **60**: 227–235.
9. Collares-Pereira M, et al. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island Azores. *European Journal of Epidemiology* 2000; **16**: 1151–1157.
10. Centre National de Référence des leptospires. Rapport annuel d'activité pour l'année 2007. Paris: Institut Pasteur.
11. Everard CO, et al. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. *European Journal of Epidemiology* 1995; **11**: 311–320.
12. Katz AR, et al. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974–998. *Clinical Infectious Diseases* 2001; **33**: 1834–1841.
13. Everard CO, Green AE. Leptospirosis in Trinidad and Grenada, with special reference to the mongoose. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1976; **70**: 57–61.
14. Gargominy O, et al. Consequences for biodiversity of plant and animal species introductions in New Caledonia [in French]. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1996; **51**: 375–402.
15. Official Website of the Association for Preservation and Rehabilitation of Wildlife Caribbean [in French] (<http://www.faune-guadeloupe.com/3-categorie-755619.html>). Accessed 17 September 2009.
16. Global Invasive Species Database (<http://www.issg.org/database>). Accessed 10 November 2009.
17. World Wildlife Fund Full Report. Trinidad and Tobago moist forests (http://www.worldwildlife.org/wildworld/profiles/terrestrial/nt/nt0171_full.html). Accessed 5 October 2009.
18. Long JL. *Introduced Mammals of the World, Their History, Distribution and Influence*. Victoria, Australia: CSIRO Publishing, 2003, p. 612.
19. Everard CO, et al. Leptospires in wildlife from Trinidad and Grenada. *Journal of Wildlife Diseases* 1983; **19**: 192–199.
20. Lorgele O, Pascal M, Pavis C. Checklist and status of the French West Indies mammal species (except Chiroptera and Cetacea) [in French]. Petit-Bourg, Guadeloupe: Association for Study and Protection of Vertebrates and Plants of the Lesser Antilles, 2001.
21. Matthias MA, Levett PN. Leptospirosis carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Medical Journal* 2002; **51**: 10–13.
22. Soubeyran Y. Exotic invasive species in French overseas collectivities. Inventory and recommendations. Synthesis by collectivity [in French]. Paris, France: IUCN French Committee, 2008, p. 141.
23. Stone CP, et al. Non-native land vertebrates. In: Stone CP, Stone DB, eds. *Conservation Biology in Hawaii*. Honolulu, Hawaii: University of Hawaii Press, 1988, p. 280.
24. Wikramanayake ED, Dinerstein E, Loucks CJ. *Terrestrial Ecoregions of the Indo-Pacific. A Conservation Assessment*. Illustrated edn. Island Press, 2001, p. 643.
25. MacArthur RH, Wilson EO. *The Theory of Island Biogeography*. Princetown Landmarks in Biology. Princeton: Princeton University Press, 2001, p. 203.
26. Lorgele O, et al. The non-flying terrestrial mammals of the French West Indies, and the recent introduction of a squirrel [in French]. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 2007; **62**: 295–314.
27. Courchamp F, Chapuis JL, Pascal M. Mammals invaders on islands: impact, control and control impact. *Biological Reviews* 2003; **78**: 347–383.
28. Howald G, et al. Invasive rodent eradication on islands. *Conservation Biology* 2007; **21**: 1258–1268.
29. Pascal M, et al. Vertebrate species in New Caledonia: invasions and extinctions. In: Beauvais M-L, Coleno A, Jourdan A, eds. *Invasive Species in New Caledonian Archipelago* [in French]. IRD Éditions, Paris, 2006, pp. 111–162.
30. O'Connell M. *Marmosa robinsoni*. *Mammalian Species* 1983; **203**: 1–6.
31. *Proceedings of the fourth meeting of Caribbean foresters*. In: *Wildlife Management in the Caribbean Islands*. Institute of Tropical Forestry and the Caribbean National Forest, Rio Piedras, Puerto Rico, 1989.
32. Germano JM, et al. Herpetofaunal communities in Grenada: a comparison of altered sites, with an annotated checklist of Grenadian amphibians and reptiles. *Caribbean Journal of Science* 2003; **39**: 68–76.
33. ICZN (International Commission on Zoological Nomenclature). Opinion 2027 (Case 3010). Usage of 17 specific names based on wild species which are predated by or contemporary with those based on domestic animals (Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalia): conserved. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 2003; **60**: 81–84.
34. World Health Organization. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. Malta: World Health Organization, 2003, p. 122.
35. Kazami A, et al. Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. *Journal of Veterinary and Medical Science* 2002; **64**: 735–737.
36. Dassanayake D, et al. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infectious Diseases* 2009; **9**: 48.
37. Lilienbaum W, et al. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* (in press).

38. Tucunduva de Faria M, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica* 2008; **108**: 1–5.
39. Kuriakose M, et al. Leptospirosis in a midland rural area of Kerala state. *Indian Journal of Medical Research* 2008; **128**: 307–312.
40. Wuthiekanun V, et al. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; **45**: 1363–1365.
41. Taylor KD, Turner LH, Everard JD. Leptospire in *Rattus* spp. on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; **94**: 102–103.
42. Levett PN, et al. Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. *West Indian Medical Journal* 1998; **47**: 15–17.
43. Baulu J, Everard CO, Everard JD. Leptospire in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops* Sabaeus) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases* 1987; **23**: 60–66.
44. Everard COR, et al. Leptospire in the marine toad (*Bufo marinus*) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases* 1988; **24**: 334–338.
45. Gravekamp C, et al. Leptospire isolated from toads and frogs on the island of Barbados. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1991; **275**: 403–411.
46. Everard CO, et al. Leptospire in the whistling frog (*Eleutherodactylus johnstoni*) on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1990; **93**: 140–145.
47. Weekes CC, Everard COR, Levett PN. Sero-epidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Veterinary Microbiology* 1997; **57**: 215–222.
48. Jones CJ, et al. Bim, a new serovar of *Leptospira interrogans* isolated from a dog in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; **19**: 946.
49. Levett PN, Whittington CU, Camus E. Serological survey of leptospirosis in livestock animals in the lesser Antilles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; **791**: 369–377.
50. André-Fontaine G. Animal leptospirosis [in French]. *Bulletin Épidémiologique de l'Afssa* 2004; **12**: 1–3.
51. Michel V. Study of the role of different wild species and of their environment on the epidemiology of zoonotic leptospirosis [in French] (thesis). Lyon: Université Claude Bernard, 2001. 251 pp.
52. Michel V, Branger C, André-Fontaine G. Epidemiology of leptospirosis. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2002; **54**: 7–10.
53. Tissot D, Mailloux M, Corroller YL. Serological study on bovine leptospirosis in Guadeloupe. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales* 1975; **68**: 420–425.
54. Levillain A. La leptospirose aux Antilles. CIRE Antilles-Guyane, 2001.
55. Everard COR, et al. Serological studies on leptospirosis in livestock and chickens from Grenada and Trinidad. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1985; **79**: 859–864.
56. Everard CO, et al. Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad; West Indies. *International Journal of Zoonoses* 1979; **6**: 33–40.
57. Adesiyun AA, et al. Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad; serovars, implications for vaccination and public health. *Journal of Veterinary Medicine B* 2006; **53**: 91–99.
58. Adesiyun AA, et al. Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. *Veterinarski Arhiv* 2009; **79**: 77–86.
59. Brethes B, et al. Epidemiological study of leptospirosis in New Caledonia [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1988; **81**: 189–197.
60. Brethes B, et al. Leptospirosis and environment. Study in the two most important focuses of New Caledonia [in French]. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 1988; **36**: 436–442.
61. Centre National de Référence des Leptospire. Rapport annuel d'activité 1999. Paris: Institut Pasteur.
62. Thevenon JG, et al. Epidemiological study of bovine leptospirosis in New-Caledonia [in French]. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1990; **166**: 903–909.
63. Domenech J, Lechapt M. Animal leptospirosis: prevalence in the South Pacific [in French]. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie* 1983; **2**: 1–8.
64. Centre National de Référence des Leptospire. Rapport annuel d'activité 1996. Paris: Institut Pasteur.
65. Centre National de Référence des Leptospire. Rapport annuel d'activité 1998. Paris: Institut Pasteur.
66. Wallace GD, Gross B, Lee R. Leptospirosis survey of small mammals on the island of Hawaii. In: 10th Pacific Scientific Congress, Honolulu, 1961.
67. Minette HP. Leptospirosis in rodents and mongooses on the Island of Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1964; **13**: 826–832.
68. Shimizu MM. Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, island of Hawaii. *International Journal of Zoonoses* 1984; **11**: 173–188.
69. Aguirre AA, et al. Infectious disease monitoring of the endangered hawaiian monk seal. *Journal of Wildlife Diseases* 2007; **43**: 229–241.
70. Katz AR, Manea SJ, Sasaki DM. Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. *American Journal of Public Health* 1991; **81**: 1310–1312.
71. Raust P. Animal leptospirosis in French Polynesia. Preliminary serological investigations [in French]. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie* 1988; **12**: 15–19.
72. Centre National de Référence des Leptospire. Rapport annuel d'activité 1997. Paris: Institut Pasteur.
73. Sigaud M, et al. Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*): natural maintenance host of leptospire? [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques* 2009; **102**: 19–20.
74. Moutou F. Survey on the Murinae fauna in La Reunion French department. Rapport DDASS, 1980.
75. Mollaret HH, Mailloux M, Debarbat F. Leptospire in the island of Reunion. III. Epidemiological study [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1983; **76**: 744–749.

76. Debarbat F, Mollaret HH, Mailloux M. Leptospiroses in the island of Reunion. II. Animal leptospiroses [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1983; **76**: 736–743.
77. Gares H. Study of infertility risk factors in Reunion island dairy herds [in French] (thesis). Toulouse: Université Paul Sabatier, 2003, 103 pp.
78. Charton A. Contribution to the epidemiological study of leptospirosis. The case of Mayotte [in French] (thesis). Lyon: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1992, 101 pp.
79. Matisoo-Smith E, *et al.* Patterns of prehistoric human mobility in Polynesia indicated by mtDNA from the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; **95**: 15145–15150.
80. Hathaway SC, Blackmore DK, Marshall RB. Leptospirosis in free-living species in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 489–496.
81. Klaassen HJBM, *et al.* Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology* 2003; **95**: 121–132.
82. Athanazio DA, *et al.* *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica* 2008; **105**: 176–180.
83. Matthias MA, *et al.* Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; **73**: 964–974.
84. Bunnell JE, *et al.* Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; **63**: 255–258.
85. Lilienbaum W, *et al.* Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro zoo, Brazil. *Research in Veterinary Science* 2002; **73**: 319–321.
86. Milner AR, *et al.* The prevalence of anti-leptospiral agglutinins in sera of wildlife in southeastern Australia. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 197–202.
87. Zwijnenberg RJG, *et al.* Cross-sectional study of canine leptospirosis in animal shelter populations in mainland Australia. *Australian Veterinary Journal* 2008; **86**: 317–323.
88. Everard CO, *et al.* Pathogenic leptospira isolates from the Caribbean Islands of Trinidad, Grenada and St. Vincent. *International Journal of Zoonoses* 1980; **7**: 90–100.
89. Collares-Pereira M, *et al.* First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *European Journal of Epidemiology* 1997; **13**: 435–441.
90. Martiny JBH, *et al.* Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 2006; **4**: 102–112.
91. Higa HH, Fujinaka TT. Prevalence of rodent and mongoose leptospirosis on the island of Oahu. *Public Health Reports* 1976; **91**: 171–177.
92. Boqvist S, *et al.* *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Veterinary Microbiology* 2003; **93**: 361–368.
93. Yanagihara Y, *et al.* Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2007; **30**: 399–413.
94. Tassinari WS, *et al.* Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health* 2008; **13**: 503–512.
95. Ward MP. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Preventive Veterinary Medicine* 2002; **56**: 203–213.
96. Hermann Storek C, *et al.* Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Nino southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiology and Infection* 2008; **136**: 1407–1415.
97. Goarant C, *et al.* Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Tropical Medicine and International Health* 2009; **14**: 1–4.

CHAPITRE V

CONTEXTES GEOGRAPHIQUES, MATERIELS ET METHODES

1. L'île de La Réunion

1.1. Géographie et climat

Émergée il y a 3 millions d'années, La Réunion est une île volcanique et montagneuse située dans l'Océan Indien, 800 kilomètres à l'Est de Madagascar, par 55°30' de longitude est, et 21°05' de latitude sud (**Figure 11**). Avec les îles Maurice et Rodrigues, La Réunion fait partie de l'archipel des Mascareignes ; elle possède une superficie de 2510 km² et une forme générale ovoïde (petit axe 45 km, grand axe 72 km) [412, 413].

L'île est constituée de deux massifs accolés :

- Le Piton de la Fournaise, volcan toujours en activité, qui occupe le tiers sud de l'île et culminant à 2631 mètres ;
- Le Piton des Neiges (3069 mètres), massif plus ancien, au centre de l'île et dominant trois cirques aux parois abruptes : Cilaos au sud, Mafate au nord-ouest et Salazie au nord-est.

Les rivières ont largement entaillé les pentes en creusant de profonds sillons perpendiculaires à la côte. Les trois principales sont la Rivière des Galets, le Bras de Cilaos, la Rivière du Mât, exutoires respectifs des cirques de Mafate, de Cilaos et de Salazie (**Figure 12**).

L'île présente une géographie physique extrêmement contrastée, des points de vue géologique, climatique, orographique, végétal et pédologique [412].

Les quatre microrégions partagent des caractéristiques propres à l'île (croissance démographique et économique rapides, chômage et précarité) mais la géographie et l'histoire les ont modelées différemment.

La microrégion Sud est la plus vaste et la plus peuplée : elle regroupe 36% de la population totale, 38% du territoire et 10 communes.

L'Ouest couvre 21% du territoire, 26% de la population et regroupe 5 communes.

L'Est dispose d'un vaste territoire (30% de l'île, 6 communes) pour une population moins nombreuse (15%).

Le Nord, sur un espace confiné (11%), regroupe une population nombreuse (24%), sur 3 communes.

Entre 1999 et 2006, le solde migratoire apparent est positif dans l'Est et le Sud ; il est négatif dans le Nord mais il devient pour la première fois négatif à l'Ouest [413].

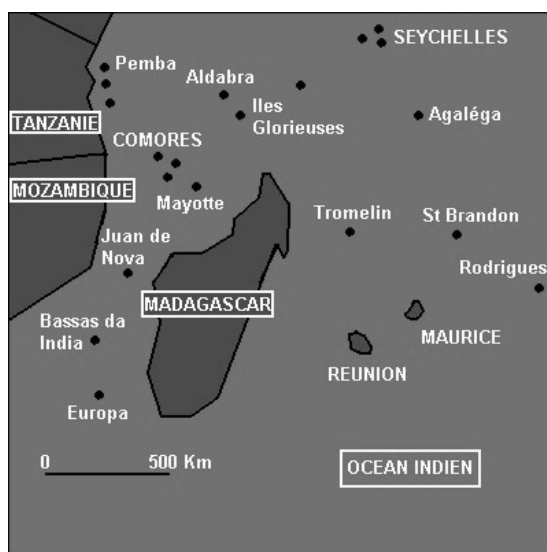


Figure 11 : La Réunion et Mayotte dans le contexte régional Océan Indien.

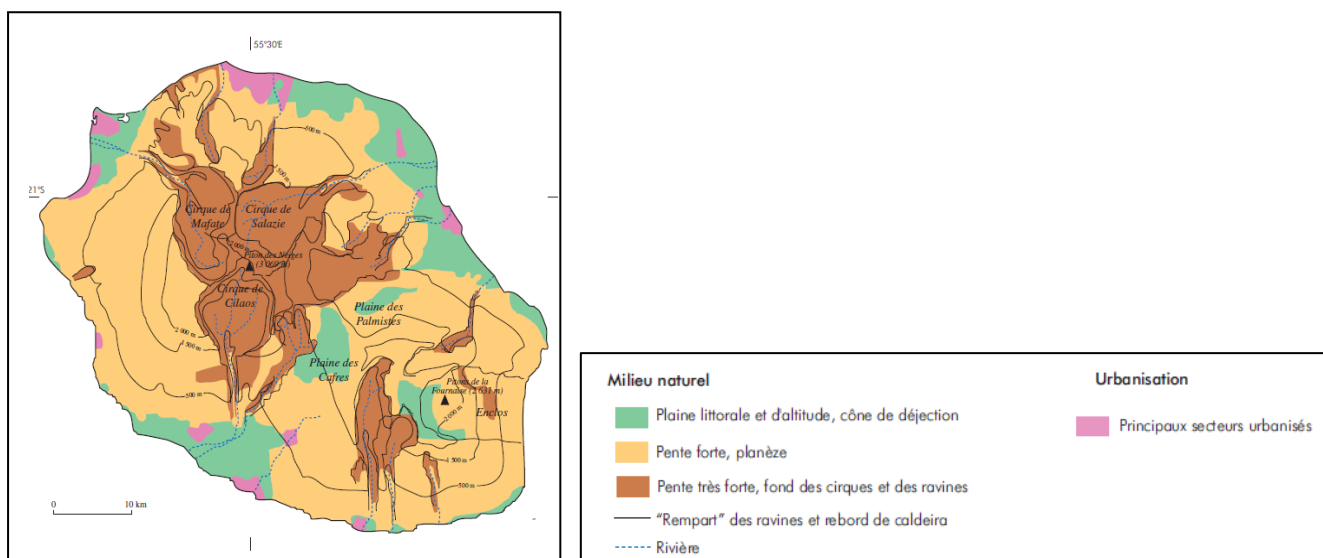


Figure 12 : Géographie de La Réunion.

(Carte réalisée par Rémy, B., Kaufmant, A., Laboratoire de cartographie, Université de La Réunion, d'après Benjamin, D. Atlas de France, "Les Outre-mers", 1998, page 104).

Le climat de La Réunion est tropical humide, mais il se singularise surtout par de grandes variabilités liées à la géographie et au relief de l'île. Il existe deux saisons marquées à La Réunion :

- La saison "des pluies", entre janvier et mars, les températures sont élevées et l'humidité est importante. C'est la période où se forme la plupart des dépressions tropicales.
- La saison "sèche", plus longue, qui va de mai à novembre [414].

Avril et décembre sont des mois de transition.

Le gradient thermique moyen est de 0,65°C pour 100 mètres de dénivellation (**Tableau 6**).

La pluviométrie moyenne annuelle montre une grande dissymétrie entre l'Est et l'Ouest de La Réunion (**Figure 13**). A l'ouest, les précipitations sont peu abondantes, alors que, même en saison sèche, les précipitations restent importantes sur l'Est. Les hauts reliefs de l'île, massifs du Piton des Neiges et du Piton de la Fournaise, sont la cause de cette dissymétrie Est/Ouest. Les précipitations tendent à se concentrer sur les régions directement exposées à l'humidité océane apportée par les alizés de secteur est, on parle de région "au vent". A l'inverse, les régions "sous le vent" (à l'ouest), qui bénéficient de l'abri du relief, sont beaucoup plus sèches et les régimes de brise y sont prédominants.

Tableau 6 : Températures en fonction de l'altitude à La Réunion (d'après [411]).

	Moyennes annuelles	Moyenne des maxima	Moyenne des minima
0 - 100 m	23 à 26°C	27 à 29,5°C	17 à 21°C
100 - 500 m	20,5 à 23°C	24,5 à 27,5°C	15 à 19°C
500 - 1000 m	16 à 21°C	20,5 à 26°C	11 à 16°C
1000 - 1500 m	14 à 17°C	19 à 21°C	9,5 à 13,5°C
1500 - 2000 m	12 à 17°C	17 à 19°C	7 à 10°C
> 2000 m	Moins de 12°C	Moins de 17°C	Moins de 7°C

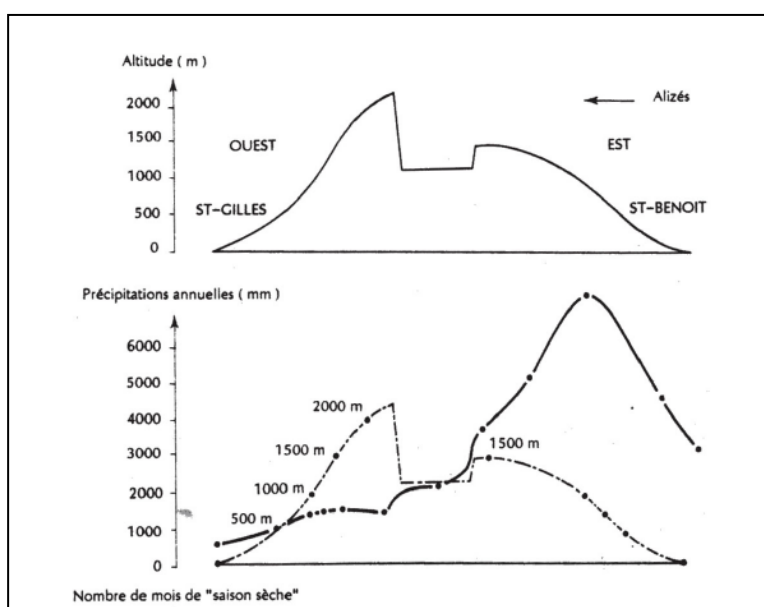


Figure 13 : Altitude – Climat : coupe schématique de l'île (Saint Gilles - Saint Benoît) [415].

1.2. La leptospirose humaine à La Réunion

L'incidence de la leptospirose à La Réunion était de 8,69 cas pour 100 000 habitants en 2009 [416]. Le sérotype prédominant identifié dans les cas humains est *Icterohaemorrhagiae* [106, 417, 418, 419]. D'autres sérotypes sont identifiés chez l'Homme lors du diagnostic sérologique : *Canicola*, *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* [419], *Hebdomadis*, *Cynopteri* [419], *Ballum*, *Wolfii* [420], *Pomona* [421], *Pyrogenes*, *Panama* [420].

L'incidence de la maladie à La Réunion montre une saisonnalité marquée, fortement corrélée à la saison des pluies (voir **Article 1** présenté dans le **Chapitre II, Partie 3.1.**). Il existe une inégalité dans la répartition des cas par commune, les communes les plus touchées étant celles situées à l'est de l'île, qui connaissent la plus forte pluviométrie [417, 418, 422].

Les années 1990 ont vu le développement du secteur tertiaire qui représente aujourd'hui la première catégorie socio-professionnelle qui s'est stabilisée autour de 20% de la population. Avec 14,6%, les ouvriers forment le deuxième groupe d'actifs, alors que les professions agricoles ont vu leur poids fortement diminuer depuis 1990, ces derniers ne représentant plus que 1% de la population de l'île, tout comme en France métropolitaine [413]. Ainsi, parallèlement à la diminution du nombre de travailleurs du secteur primaire et à l'augmentation des employés du tertiaire, le nombre de personnes exposées professionnellement à la leptospirose diminue à La Réunion, ce qui peut, en partie, expliquer la diminution de séroprévalence, passée de 1,1% en 1987 [201] à 0,6% en 2006 [423].

Article 3 : Desvars A, Gigan J, Hoarau G, Gérardin P, Favier F, Michault A. 2011. Seroprevalence of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) assessed by microscopic agglutination test on paper disc-absorbed whole blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 85(6): 1097-1099.

Short Report: Seroprevalence of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) Assessed by Microscopic Agglutination Test on Paper Disc-Absorbed Whole Blood

Amélie Desvars, Jimmy Gigan, Géraldine Hoarau, Patrick Gérardin, François Favier, and Alain Michault*

Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMRCMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte Clotilde, La Réunion, France;
Laboratoire de Bactériologie—Parasitologie—Virologie—Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France; Centre d'Investigation Clinique—Epidémiologie Clinique (CIC-EC) de La Réunion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/CHR/Université de La Réunion/Union Régionale des Médecins Libéraux de La Réunion (URMLR), GHSR, CHR, Saint Pierre, La Réunion, France

Abstract. In the last decade, leptospirosis has emerged as a globally important infectious disease. Humans most commonly become infected through occupational, recreational, or domestic contact with the urine of carrier animals, either directly or through contaminated water or soil. The disease occurs in urban areas of industrialized and developing countries as well as rural regions worldwide. We present a retrospective study conducted in 2006 on 2,269 randomly selected Reunion Island inhabitants. Blood sampling was performed on individual blotting papers, and microscopic agglutination test (MAT) was conducted on paper disc-absorbed (PDA) blood. We showed that seroprevalence of leptospirosis was $0.66\% \pm 0.34$ in the global population of Reunion Island, which is 1.78 lower than the seroprevalence estimated 20 years before. The serological method is described, and the results discussion focuses on methodology and socio-economic factors.

Leptospirosis is a potentially life-threatening zoonosis with a wide geographic distribution occurring in many mammalian species, including humans. The disease is caused by pathogenic serovars of *Leptospira* spp., a spirochete bacteria. The pathogenesis is systemic and associated with fever and renal, hepatic, pulmonary, and reproductive dysfunctions. The clinical spectrum is broad and not specific, whereas the majority of cases are probably unapparent.¹ Diagnosis is routinely based on the microscopic agglutination test (MAT), which is actually recognized to be serogroup-specific. Reunion Island is a French department located in the Indian Ocean, where the incidence of leptospirosis is high, with 8.69 cases per 100,000 inhabitant per year in 2009.² Nevertheless, because of the great number of paucisymptomatic forms, reported cases underestimate the real incidence of leptospirosis. In 1987, a large serosurvey based on a large sample of 3,338 Reunion Islanders estimated a community seroprevalence of 1.18% at the seropositivity cutoff of 1/100.³ In the present study, using the blotting papers collected on the sample of the population-based SEROCHIK survey (a previous serosurvey aimed at assessing the post-epidemic attack rate of Chikungunya fever in 2006),⁴ we report a simple and original method to estimate the magnitude of seroprevalence of human leptospirosis in 2006 in a large random sample of 2,269 individuals. We compare our results for 2006 with the seroprevalence rate found in 1987^{3,5} and discuss risk factors that can influence the prevalence of leptospirosis in Reunion Island.

The 2,442 participants of the SEROCHIK survey belonged to a random sample consisting of a two-stage sampling. At the first-stage sampling, households were randomly selected by the Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) over 23 townships, covering the entire territory of the island (except the Mafate circus). At the second-stage sampling, one participant per household was selected accord-

ing to the Kish method.⁴ For each individual, blood was taken with a finger stick on individual blotting papers (Whatman 903 ProteinSaver Card, Whatman, Dassel, Germany). The paper was air-dried before storing at -20°C until analysis.

To optimize the serological method using MAT on paper disc-absorbed (PDA) blood, we tested different technical parameters on 22 seropositive and 30 seronegative patients, who were previously diagnosed (from 2002 to 2005) by classical MAT, conducted on fluid serum at our laboratory. Among the seropositive patients, 11 were seropositive at titer 1/200 and 11 were seropositive at titer 1/6,400 with classical MAT. We used the classical MAT, which is the serological method of reference, to evaluate the MAT on PDA blood, and we compared antibody titers obtained for the 52 previously diagnosed patients with both methods. Whole blood from each positive patient was first absorbed within the specific circular area on a blotting paper. Then, the remaining blood was centrifuged, and the serum used for a second analysis with classical MAT. A circular area was cut in the PDA blood, and the blood was eluted by soaking overnight at 4°C in a 2-mL microtube with Sorensen buffer at the dilution 1:25 or with a 50/50 mix of Sorensen buffer and phosphate buffer saline (PBS). Two circular surfaces ($S = \pi r^2$) of the PDA blood were tested: $S1 = 1.5^{\circ}\pi$ and $S2 = 2.5^{\circ}\pi$ mm². The volume of elution buffer was adjusted depending on the surface of the PDA blood considered: 288 μL for $S1^{\circ}$ and 800 μL for $S2$. Then, elution of the PDA blood samples was completed by either leaving the PDA blood in elution buffer one night at 4°C or leaving it 2 hours at room temperature with slow shaking or grinding for 2 minutes at 30 Hz in a vibratory shaker (Mixer mill MM 301, Retsch GmbH, Haan, Germany). Then, samples were centrifuged for 15 minutes at 10,000 rpm (25°C). The supernatant was considered equivalent to a 1:100 dilution of serum and tested in the same way as fresh serum by classical MAT.^{6,7}

To estimate the seroprevalence of leptospirosis in the global population, the MAT was conducted on 2,269 PDA blood samples collected in the population described above. The antigens used were live cultures of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni strain isolated in Reunion Island, *L. interrogans* serogroup Pyrogenes serovar

*Address correspondence to Alain Michault, Laboratoire de Bactériologie—Parasitologie—Virologie—Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), BP350, Avenue Mitterrand Saint Pierre cedex 97448, La Réunion, France. E-mail: alain.michault@chr-reunion.fr

TABLE 1
Organisms used as capture antigens in the MAT represent four different serogroups

Genus	Species	Serogroup	Serovar	Strain
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Strain isolated in Reunion Island
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>Leptospira</i>	<i>biflexa</i>	Semarangae	Patoc	Patoc I

Pyrogenes strain Salinem, and *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Sejroe strain M84 (Table 1). We choose strains representative of three serogroups (Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, and Sejroe), because they are the most frequently diagnosed serogroups in clinical cases in Reunion Island; also, one locally isolated strain was chosen, because antibody titers to local isolates are often higher than titers to laboratory stock strains of serovars within the same serogroup.¹ The non-pathogenic strain *L. biflexa* serogroup Semarang serovar Patoc strain Patoc I (Table 1) was also included in the panel, because it cross-reacts with many pathogenic serogroups,⁸ allowing the detection of antibodies against not tested serogroups.

We found that using Sorensen buffer 1:25 without PBS was better on the antibody titers for both serological methods. Leaving the PDA blood sample one night at 4°C was not efficient to elute the antibodies, whereas grinding the sample or leaving it 2 hours at room temperature with slow shaking was equivalent. Thus, we chose the grinding method, because it was saved. We observed that, for the same positive patient, results with the circular surfaces S1 and S2 were similar. Thus, we chose to use the circular surface S1 ($r = 1.5$ mm), because it used a smaller surface of PDA blood.

All negative patients tested with the classical MAT method on fresh serum were negative with the method on PDA blood. Antibody titers against leptospirosis obtained with the MAT conducted on PDA blood for the 11 patients positive at titer 1/6,400 were one- to two-fold dilutions lower in titers compared with positivity obtained with MAT on fresh serum. In contrast, antibody titers for the 11 patients positive at titer 1/200 were equal or one-fold dilution lower (Table 2).

Because cross-reactions between serogroups are common as well as paradoxical reactions, in which the initial immune response is directed to a heterologous serovar or serogroup, MAT is of little value for the identification of the infecting serovar in individual cases of leptospirosis.⁹ In consequence,

our study presents only the seroprevalence of the disease and not the potential infecting serovars.

The seroprevalence of leptospirosis in the global population of Reunion Islanders in 2006, evaluated on a sample of 2,269 persons, was $0.66\% \pm 0.34$ (95% confidence interval) at the seropositivity cutoff of 1/100. This seroprevalence was 1.78 times lower than that reported by Duval and others⁵ in 1987. Moreover, the incidence of the disease in 2006 was 7.52 cases per 100,000 inhabitants per year² (i.e., 2.05 times lower than in 1987).⁵

During this 20-year period and still now, Icterohaemorrhagiae remains the serogroup involved in the majority of the clinical cases in Reunion Island.^{2,3} We limited the number of tested serogroups to four; thus, if non-included serogroups with titers close to the threshold of positivity are circulating in the population of Reunion Island, they were not detected by our MAT. Nevertheless, major serogroups found in symptomatic patients were similar in 1987 and 2006 (Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, and Sejroe)^{2,10}; in consequence, if minor serogroups were circulating in 2006, they would not affect the global seroprevalence of leptospirosis in the population.

Several socioeconomic factors may explain the decrease in the seroprevalence of leptospirosis during 19 years in Reunion Island. The first factor is the distribution of the population with regard to climatic factors. Indeed, rainfall is very abundant in the east ($> 2,000$ mm/year), whereas the north and south count less than 2,000 mm/year; also, the western coastal region counts less than 100 mm/year. Rainfall favors indirect contamination.¹ Between 1987 and 2006, the population of the west side of Reunion Island increased from 1.4% to 4%,¹¹ whereas there was a global decrease in the population of the east side. In consequence, the relative percentage of the population exposed to the climatic risk factor decreased between 1987 and 2006.

Second, changes in the occupational activities of the population may have influenced the seroprevalence of the disease. Working in fields or outdoors is a well-known risk factor of contamination for leptospirosis,¹² whereas office workers are less exposed. In 1987, the service sector used less than 75% of working people against 85% in 2006.¹¹ Moreover, in 2006, Reunion Island counted only 7.7% of farm workers versus 14% in 1987.¹¹ In consequence, in two decades, the number of people daily exposed to the environmental reservoir of the disease decreased greatly.

Third, housing in Reunion Island has changed dramatically between 1987 and 2006, with an increase in the number of families living in apartments: 17.9% in 1987 versus 28.4% in 2006.¹¹ Gardening and presence of rodents in the living environment are risk factors for acquiring clinical leptospirosis,¹³ whereas living in an apartment is a protecting factor of contamination.¹² Moreover, the improvement of sanitary living conditions in Reunion Island (23.9% of the households with no running water, toilets, or bathroom in 1987 versus 5% in

TABLE 2

Results of the MAT conducted on PDA blood on the 22 positive patients

Serum	Positive patients at dilution 1/6,400*	Positive patients at dilution 1/200*
1	Positive 1/3,200	Positive 1/200
2	Positive 1/1,600	Positive 1/200
3	Positive 1/1,600	Positive 1/200
4	Positive 1/1,600	Positive 1/200
5	Positive 1/3,200	Positive 1/200
6	Positive 1/1,600	Positive 1/200
7	Positive 1/3,200	Positive 1/200
8	Positive 1/1,600	Positive 1/200
9	Positive 1/1,600	Positive 1/200
10	Positive 1/1,600	Positive 1/100
11	Positive 1/1,600	Positive 1/100

* With classical MAT conducted on fresh serum.

2006)¹¹ as well as recurrent awareness campaigns about the disease among the population may have also participated in the reduction of the incidence of the disease.

In conclusion, we have shown that the PDA whole-blood sample method offers convenience in the collection, holding, and shipping of samples. This method can be very useful for large-scale studies or even for studies in the children population, because the sampling is not invasive and easy to perform. The method can be easily used in developing countries because of its cheapness. Also, conservation of the blood before analysis does not require immediate refrigeration. We have also evidenced that prevalence of leptospirosis has declined in Reunion Island between 1987 and 2006 and that it could be explained by socio-economic factors linked to sanitary improvements and the transition from a rural to urban way of life.

Received July 20, 2011. Accepted for publication August 25, 2011.

Acknowledgments: The authors thank Morgane Chambost and Mathieu Nicole for their contribution to this work and Vincent Michault for his help on the manuscript.

Authors' addresses: Amélie Desvars, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMRMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte Clotilde, La Réunion, France and Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mail: amel.desvars@gmail.com. Jimmy Gigan, Géraldine Hoarau, and Alain Michault, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mails: jimmy.gigan@chr-reunion.fr, guynoeelhoarau@gmail.com and alain.michault@chr-reunion.fr. Patrick Gérardin and François Favier, Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique (CIC-EC) de La Réunion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/CHR/Université de La Réunion/Union Régionale des Médecins Libéraux de La Réunion (URMLR), Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mails: patrick.gerardin@chr-reunion.fr and francois.favier@chr-reunion.fr.

REFERENCES

- Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Institut Pasteur, 2010. *Rapports d'activité du Centre National de Référence des Leptospiroses*. Available at: <http://www.pasteur.fr/px/easysite/go/03b-000031-010/actualites-rapports>. Accessed December 21, 2010.
- Duval G, Michault A, Baranton G, Law-Koune JD, Folio G, Bertil G, Guiserix J, 1991. Sero epidemiological survey on human leptospirosis in Reunion Island. *Rev Epidemiol Sante Publique* 39: 135–141.
- Gérardin P, Guernier V, Perrau J, Flanu A, Le Roux K, Grivard P, Michault A, de Lamballerie X, Flahault A, Favier F, 2008. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis* 8: 99.
- Law-Koune JD, Duval G, Michault A, Baranton G, De Camaret P, Lemahieu JM, Van-der-Linden T, 1989. Human leptospirosis in Reunion Island: epidemiological study during three years (1985–1987). *Bull Soc Pathol Exot* 82: 185–191.
- Flanu A, Le Roux K, Grivard P, Le Pors AK, Gigan J, Michault A, Gérardin P, Favier F, 2007. Valeur discriminante du test de dépistage du Chikungunya sur buvard. *Bull Soc Pathol Exot* 100: 356–357.
- Kingscote HF, 1969. Leptospirosis survey in a white-tailed deer herd in Ontario: comparative use of fluid and paper disc-absorbed blood. *J Wildl Dis* 5: 68–72.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Pérolat P, 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci.
- Levett PN, 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36: 447–452.
- Centre National de Référence des Leptospiroses, 2007. *Activity Report 2006*. Paris, France: Institut Pasteur.
- Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques, 2010. *La Revue Economie de La Réunion*. Available at: <http://www.insee.fr/fr>. Accessed January 26, 2011.
- Sarkar U, Nascimento S, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI, 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 66: 605–610.
- Bovet P, Yersin C, Mérien F, Davis CE, Pérolat P, 1999. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *Int J Epidemiol* 28: 583–590.

2. L'île de Mayotte

2.1. Géographie et climat

Située entre l'équateur et le tropique du Capricorne à l'entrée nord du Canal du Mozambique, au niveau du 45^{ème} méridien Est et entre les 12^{ème} et 13^{ème} parallèles Sud, l'île de Mayotte fait partie de l'archipel des Comores. Mayotte est distante de 1500 km de l'île de La Réunion. Elle est située à 400 km de la côte Est de l'Afrique et à 300 km de la côte occidentale de Madagascar (**Figure 11**).

Mayotte est la plus ancienne île de l'archipel comorien (environ 8 millions d'années). Comme les autres îles des Comores, Mayotte est d'origine volcanique. D'une superficie de 374 km², Mayotte comprend deux îles principales, Petite-Terre (11 km²) et Grande-Terre (363 km²), ainsi qu'une trentaine d'îlots épars. Le relief est dominé par des massifs basaltiques tels le mont Bénara dans la partie centrale (660 m) et le mont Choungui dans le Sud (594 m) (**Figure 14**).

Mayotte est un département d'outre-mer depuis 2011. Sa population atteignait 186 452 habitants en 2007 et la densité moyenne sur l'archipel s'élevait à 511 habitants/km² (recensement INSEE du 31 juillet 2011). Cette population est de plus en plus concentrée autour du pôle urbain de Mamoudzou, chef-lieu de l'île, qui absorbe plus de 50 000 habitants, soit 27% de la population totale.

Mayotte jouit d'un climat de type tropical humide, qui présente deux saisons bien marquées :

- L'été austral, correspondant à la saison des pluies, s'étend d'octobre à mars. Les températures y sont particulièrement élevées, et le taux d'humidité important. Cette saison concentre l'essentiel des précipitations annuelles et c'est aussi la saison où l'île est exposée à des risques cycloniques.
- La saison sèche, ou hiver austral, s'étend d'avril à septembre. L'île est alors soumise au régime des alizés, vents secs venant du sud-est. Les températures et l'humidité sont moins élevées que durant la saison des pluies, et la pluviométrie est faible [424].



Figure 14 : L'île de Mayotte.

2.2. La leptospirose humaine à Mayotte

La leptospirose est endémique à Mayotte. L'incidence annuelle entre 1984 et 1989 était de 3,83 cas pour 100 000 habitants par an [425], mais depuis 2007, les méthodes de diagnostic (notamment la culture) ont été développées localement et l'incidence est aujourd'hui estimée à 45,16 [228]. Si les sérogroupes dominants chez l'Homme à Mayotte étaient traditionnellement, et selon les années, Grippotyphosa, Sejroe et Pyrogenes (*données des rapports annuels du Centre National de Référence des Leptospires de Paris, CNRL*), depuis l'inclusion fin 2007 du séro groupe Mini dans le panel d'antigènes utilisé pour le test de microagglutination, ce dernier apparaît comme le plus représenté chez les cas hospitalisés à Mayotte [416]. En 2009, 84 cas de leptospirose ont été diagnostiqués par PCR, parmi lesquelles 41 cultures positives ont été obtenues, permettant une meilleure identification des souches circulantes. Les sérogroupes principaux étaient Mini (28/41), Pyrogenes (2/41), Pomona (8/41) et Grippotyphosa (1/41) [74, 228] (**Figure 15**).

Le sérotype Icterohaemorrhagie ne semble pas circuler chez l'Homme à Mayotte [228].

Le sérovar Mini a été isolé la première fois à partir d'un patient en Italie en 1940. D'autres sérovars ont été ensuite isolés à partir d'humains et d'animaux (opossums, bandicoots⁷, rats-laveurs) et classés dans le sérotype Mini en fonction de leurs déterminants antigéniques. Des anticorps dirigés contre le sérotype Mini (sérovar Szwajizak) ont aussi été retrouvés chez des rats noirs, des souris, des hérissons (*Hemiechinus auritus* et *Erinaceus europaeus*), des bovins et des chiens en Israël [426], chez des capucins bruns (*Cebus apella*) au Brésil [427] et chez les chiens en Thaïlande [315]. Il se pourrait donc que Mini ait un spectre d'hôte assez large.

Les sérotypes Mini et Hebdomadis présentent des communautés antigéniques [74]. Cet exemple illustre également l'importance d'utiliser dans le diagnostic par MAT un panel de sérotypes représentant les souches circulant localement.

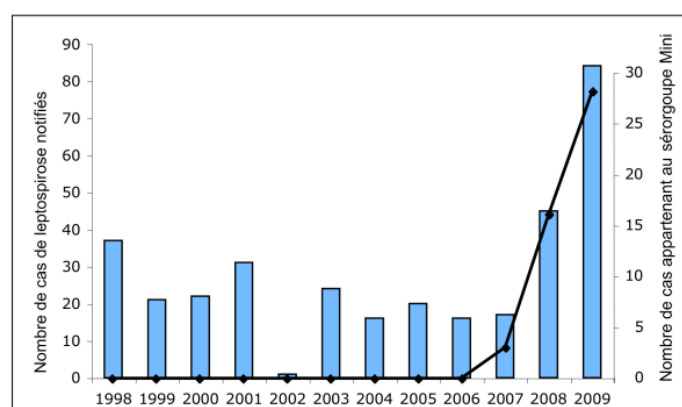


Figure 15 : Distribution des cas du sérotype Mini (ligne continue) par rapport au nombre total de cas de leptospirose à Mayotte (histogramme bleu), entre 1998 et 2009 (d'après [73]).

Ce graphique illustre l'effort de recherche de la maladie chez les patients depuis 2007 ainsi que le changement dans le panel utilisé pour le MAT, avec l'ajout du sérotype Mini.

En 2011, Bourhy *et al.* [228] ont démontré qu'à Mayotte que les leptospires responsables de cas cliniques chez l'homme appartiennent aux espèces génomiques *L. borgpetersenii* (52,1% des souches décrites), *L. kirschneri* (23,4%), *L. interrogans* (8,5%), et à l'espèce nouvellement découverte, proche de *L. borgpetersenii* (*borgpetersenii*-like), et

⁷ Bandicoot : Ordre : Marsupialia ; famille Peramelidae.

actuellement considérée comme endémique de Mayotte *L. borgpetersenii* groupe B (15,9%, **Figure 16** et **Figure 17**).

La circulation d'au moins quatre espèces génomiques, dont une présentant un profil génétique non décrit jusque là montre que l'épidémiologie de la leptospirose est très spéciale sur cette île et pose la question des réservoirs animaux et de l'origine d'une telle diversité.

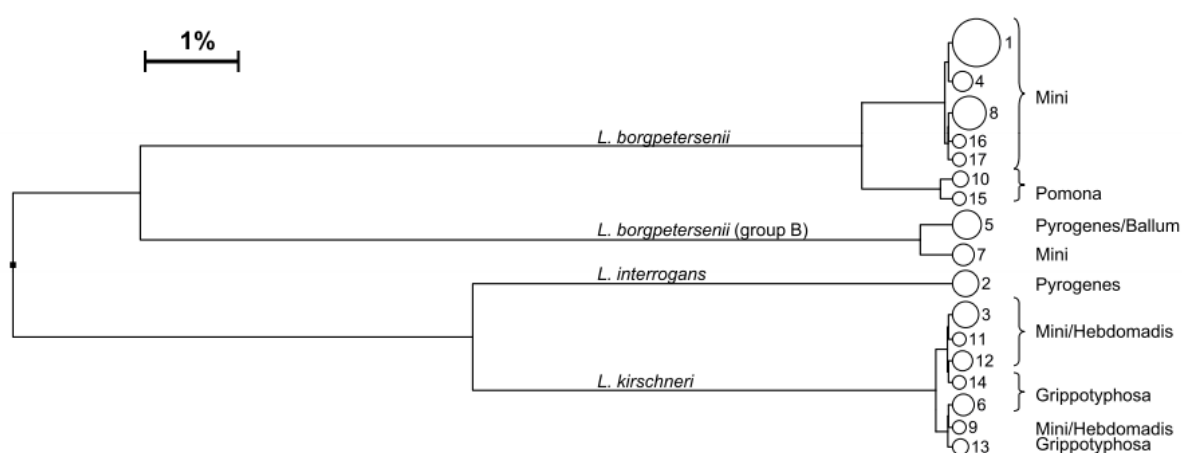


Figure 16 : Arbre phylogénique des isolats de *Leptospira* (n=95) basé sur les séquences de gènes Multiple Locus Sequence Typing (MLST) [228].

La méthode utilisée est la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Les gènes utilisés pour la construction de l'arbre sont *adk*, *lipL32*, *secY*, *rrs2* et *lipL41*. Les espèces, ST (sequence types) et sérogroupes probables sont indiqués. La taille des cercles correspond au nombre de souches pour chaque ST.

ST9 correspond à un cas importé depuis les Comores [228].

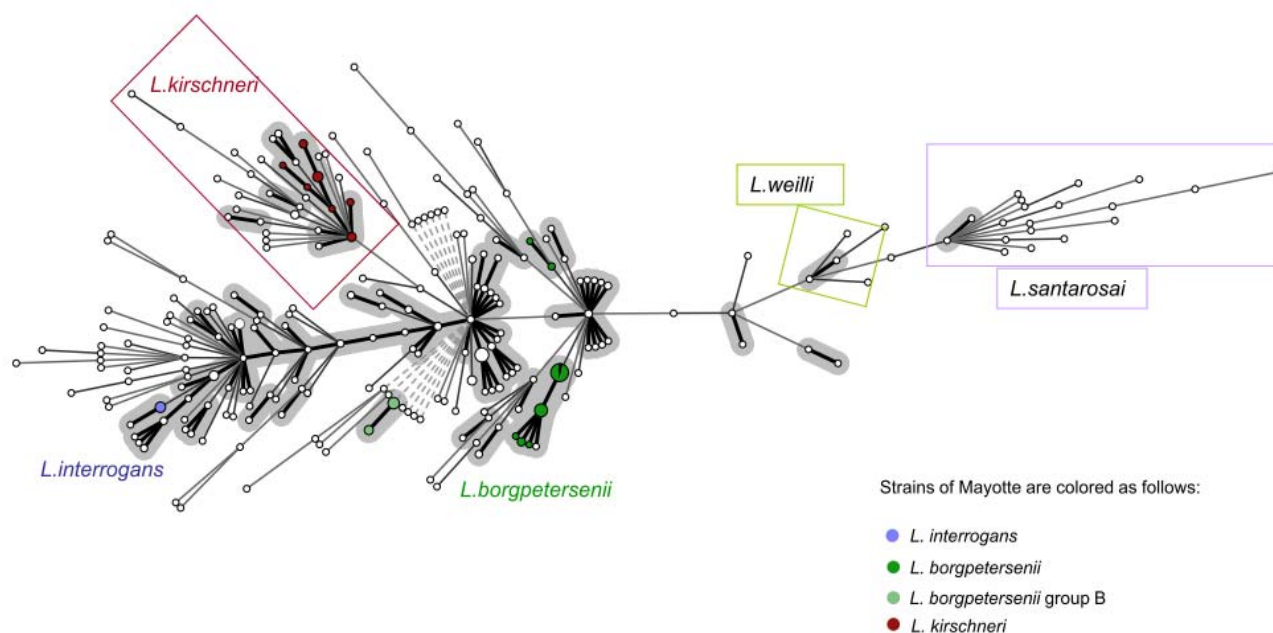


Figure 17 : Arbre couvrant de poids minimal (Minimum Spanning Tree, MST) de 372 souches de *Leptospira*, incluant des souches de Mayotte et des souches précédemment décrites [228].

L'arbre est basé sur les profils alléliques des gènes *adk*, *lipL32*, *rrs2*, *secY*, et *lipL41*. Les cercles non colorés correspondent aux génotypes décrits précédemment par Nalam *et al.* [428], les cercles colorés correspondent aux souches mahoraises. Les traits gras, pleins et discontinus entre les cercles correspondent respectivement à un, deux ou plus mismatch(s) alléliques (les liens avec plus de deux mismatches alléliques ne sont pas fiables) [228].

3. Monographies des mammifères étudiés à La Réunion et à Mayotte

Nous présenterons dans ce chapitre de brèves monographies des espèces mammaliennes étudiées dans le cadre de nos recherches [429]. Les espèces de micromammifères (rats, souris, musaraignes) ont toutes été introduites accidentellement sur les îles par les premiers navigateurs. Les espèces de rente ont été introduites volontairement par l'homme pour le développement local de l'élevage.

Un arbre taxonomique regroupant ces espèces est présenté en **Annexe A**, et l'**Annexe B** présente des photographies de quelques espèces sauvages.

3.1. La Souris grise

Mus musculus Linné, 1758

Ordre : Rodentia ; Famille : Muridae

Nom vernaculaire anglophone : House mouse

Région d'origine : Sous continent Indien et Asie du Sud-est.

Description : Micromammifères mesurant entre 65 et 95 mm, pesant entre 12 et 30 g.

Eléments d'écologie : Espèce omnivore, commensale de l'Homme, c'est l'un des mammifères les plus largement distribués dans le monde. La Souris se rencontre dans tous les milieux anthropisés où elle peut atteindre une forte densité. La reproduction a lieu toute l'année, une femelle peut donner 10 à 13 portées par an, de 6 à 12 petits chacune.

Introduction à La Réunion : Antérieure 1750.

Introduction à Mayotte : IX^e-X^e siècle.

3.2. Le Rat noir

Rattus rattus Linné, 1758

Ordre : Rodentia ; Famille : Muridae

Noms vernaculaires anglophones : Ship rat, Black roof

Région d'origine : Sous-continent Indien.

Description : Petit rongeur mesurant environ 200 mm (sans la queue), pesant 120 à 160 g. La longueur de la queue est supérieure à celle du corps, permettant la distinction avec le Rat surmulot.

Eléments d'écologie : Espèce commensale de l'Homme, omnivore généraliste et opportuniste, le Rat noir occupe tous les habitats, et si les conditions sont adéquates, se reproduit toute l'année, les femelles ayant de 3 à 6 portées par an, chacune pouvant compter jusqu'à 10 jeunes. Animal nocturne, le Rat noir est un excellent grimpeur.

Introduction à La Réunion : Le Rat noir a été introduit depuis l'Europe vers 1670 [430].

Introduction à Mayotte : Le Rat noir a probablement été introduit à Mayotte depuis Madagascar au VIII^e siècle [430].

3.3. Le Rat surmulot

Rattus norvegicus Berkenhout, 1769

Ordre : Rodentia ; Famille : Muridae

Noms vernaculaires anglophones : Brown rat, Common rat, Norway rat

Région d'origine : Nord de la Chine ou de la Mongolie.

Description : Rongeur mesurant 190 à 265 mm (sans la queue) et pesant 130 à 300 g. La longueur de la queue est inférieure à la longueur du corps.

Eléments d'écologie : Espèce commensale de l'Homme, omnivore généraliste et opportuniste, le Rat surmulot occupe tous les habitats et jusqu'à 3000 m d'altitude à La Réunion. Il semble néanmoins préférer les habitats humides avec une source d'eau à proximité. La reproduction peut avoir lieu toute l'année et une femelle peut avoir 4 à 7 portées par an, de 3 à 12 petits chacune. Animal nocturne, le Rat surmulot est un excellent nageur.

Introduction à La Réunion : 1735.

Introduction à Mayotte : absent de cette île.

3.4. La Musaraigne musquée

Suncus murinus Linné, 1766

Ordre : Soricomorpha ; Famille : Soricidae

Autres noms vernaculaires français : Grande Pachyure, Pachyure musquée, Rat musqué (créole Réunion)

Noms vernaculaires anglophones : Asian house shrew, Asian musk shrew

Région d'origine : Sud de l'Asie.

Description : Micromammifère mesurant jusqu'à 150 mm (sans la queue), pesant, chez les mâles adultes, entre 33 et 147 g. Les femelles sont plus petites. La queue peut atteindre 80 mm. La Musaraigne musquée est caractérisée par un long museau pointu, une grande variabilité de taille, poids et couleur.

Eléments d'écologie : Insectivore, principalement terrestre, la musaraigne fréquente les zones de forêts, agricoles et d'activités humaines auxquelles elle est particulièrement associée. A La Réunion, elle se rencontre dans tous les habitats terrestres, jusqu'à plus de 2500 m d'altitude.

Introduction à La Réunion : 1730.

Introduction à Mayotte : absent de cette île (mais *Suncus madagascariensis* est présente à Mayotte).

3.5. Le Tangue

Tenrec ecaudatus Schreber, 1778

Ordre : Lipotyphla ; Famille : Tenrecidae

Noms vernaculaires anglophones : Common tenrec, Tailless tenrec

Région d'origine : Espèce endémique de Madagascar [431].

Description : Grand insectivore, de 1600 à 2400 g. La longueur de la tête et du corps est comprise en 265 et 390 mm. La forme général de l'animal ressemble à celle de l'opossum nord américain, mais sans la longue queue. Le museau est long et pointu et le corps est couvert d'épines [431].

Éléments d'écologie : Animal insectivore et omnivore dont le régime alimentaire varie selon les saisons et la zone de vie. L'espèce est terrestre, présente dans de nombreux habitats : forêts, zones agricoles, prairies... [431] Introduit comme espèce gibier à La Réunion (Arrêté Ministériel du 25 août 2008) et à Mayotte. La saison de reproduction est variable en fonction de la latitude : le pic des naissances a lieu en janvier entre les latitudes 12° et 25° Sud à Madagascar, tandis que le pic se situe fin novembre-début décembre en zone plus tropicale comme les Seychelles (4°S). La portée compte généralement 20 à 25 petits, et jusqu'à 32 [431].

Introduction à La Réunion : 1801 [430].

Introduction à Mayotte : IX^e siècle [430].

3.6. Le Chat domestique

Felis catus Linné, 1758

Ordre : Carnivores ; Famille : Felidae

Région d'origine : Le Chat domestique (et ses formes marronnes) semblent avoir pour ancêtre sauvage une sous-espèce du Chat sauvage, *Felis silvestris lybica* Forster, 1780, originaire

d'Afrique et du Moyen-Orient. La domestication du Chat sauvage s'est faite au Moyen-Orient avec l'apparition des premiers villages agricoles au niveau du croissant fertile⁸. La toute première trace de domestication connue et datée de 9000 à 9500 ans, a été relevée dans l'île de Chypre.

Description : Félin mesurant environ 50 cm de long (sans la queue), de 20 à 30 cm de haut, et pesant entre 3 et 6 kg.

Eléments d'écologie : Le Chat domestique ou haret s'adapte facilement à de nombreux environnements. On le retrouve sur tous les continents (sauf l'Antarctique). A La Réunion, le Chat peut se trouver jusqu'à 3000 m d'altitude. C'est un carnivore dont le régime alimentaire est surtout constitué d'oiseaux, de reptiles et de petits mammifères. La mise-bas a lieu généralement 2 fois par an, avec plusieurs jeunes par portée.

Introduction à La Réunion : Introduit depuis l'Europe pour contrôler les populations de rats, vers 1685 [430].

Introduction à Mayotte : VIII^e siècle.

3.7. Le Chien

Canis familiaris Linné, 1758

Ordre : Carnivores ; Famille : Canidae

Région d'origine : Le Chien domestique et marron descend du Loup gris *Canis lupus* Linné, 1758. Le Loup gris est la première espèce à avoir été domestiquée, tout d'abord au Moyen-Orient, il y a environ 15 000 ans. Le Chien domestique aurait ensuite été répandu en Europe, Asie, puis vers l'Amérique et l'Australie.

Eléments d'écologie : Carnivore à tendance omnivore, le Chien peut être observé dans différents milieux. Le Chien connaît deux cycles annuels de reproduction.

Introduction à La Réunion : Non documentée.

Introduction à Mayotte : Non documentée.

⁸ Le croissant fertile comprend les territoires des États actuels du Liban, de Chypre, du Koweït, d'Israël, de Palestine (Cisjordanie et Gaza) ainsi que des parties de la Jordanie, de la Syrie, de l'Irak, de l'Iran, de l'Égypte (sur ce point, il ne semble pas y avoir consensus) et le sud-est de la Turquie.

3.8. Le Cerf de Java

Rusa timorensis de Blainville, 1822

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Cervidae

Noms vernaculaires anglophones : Java deer, Rusa deer

Région d'origine : Asie du Sud-est (Indonésie).

Description : Petit cervidé tropical, le dimorphisme sexuel est marqué : les mâles sont plus lourds (80-125 kg) et plus grands (longueur : 130-215 cm, hauteur au garrot : 80-110 cm) que les femelles et portent saisonnièrement des bois.

Eléments d'écologie : Herbivore ruminant opportuniste, son régime alimentaire varie en fonction des ressources disponibles. A La Réunion, le Cerf de Java est une espèce gibier dont la chasse est autorisée (Arrêté Ministériel du 25 août 2008) pendant environ 5 mois chaque année. Il existe aussi à La Réunion quelques élevages de Cerfs.

Introduction à La Réunion : Aux alentours de 1760 puis 1954.

Introduction à Mayotte : absent.

Statut de l'élevage à La Réunion : La filière cervidés comptabilise 3200 biches reproductrices pour 10 éleveurs. L'élevage des cerfs est surtout semi-extensif, bien qu'il existe aussi des engraisseurs en bâtiment pour cette filière (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

3.9. Le Bovin

Bos taurus Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Bovidae

Région d'origine : Les premières traces de domestication de l'Aurochs (*Bos primigenius* Bojanus, 1827) remonteraient à 9000 ans avant JC en Turquie et seraient à l'origine des bovins européens.

Introduction à La Réunion : 1649 [430].

Introduction à Mayotte : IX^e siècle [430].

Statut de l'élevage à La Réunion : La filière "bovin viande" regroupe 1730 éleveurs, compte 32 000 têtes, dont les races principales sont la Blonde d'Aquitaine et la Limousine. La filière "bovin lait" compte environ 3700 vaches laitières (surtout Prim'Holstein) et 90 éleveurs (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

Statut de l'élevage à Mayotte : 17 150 bovins sont dénombrés à Mayotte, qui se répartissent dans 3600 élevages, avec, en moyenne, 4,8 bovins par élevage. Presque trois quarts des bovins sont élevés à l'attache, déplacés au plus proche des ressources fourragères, et 15% des animaux sont valorisés pour la production laitière (données du Recensement Agricole 2010, Site Internet du Ministère de l'Agriculture <http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/mayotte-665>).

3.10. La Chèvre

Capra hircus Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Bovidae

Région d'origine : Les premières traces de domestication de la Chèvre égagre (*Capra aegagrus*) remonteraient à environ 10 000 ans en Turquie et sur les hauts plateaux d'Iran.

Introduction à La Réunion : 1610 [430].

Introduction à Mayotte : IX^e-XIII^e siècle [430].

Statut de l'élevage à La Réunion : L'élevage caprin conserve encore un caractère familial et traditionnel à La Réunion et la totalité des bêtes n'est pas identifiée ni recensée. Les estimations officielles comptent 23 000 chèvres reproductrices (mais le chiffre est probablement bien supérieur), et 1400 éleveurs déclarés (<http://www.reunion.chambagri.fr>). Il existe une population de chèvres marronnes vivant dans les régions escarpées de l'île, et dont la taille de la population est difficile à estimer.

Statut de l'élevage à Mayotte : Près de 2200 exploitations élèvent des ovins et des caprins. Mais 93% de ces éleveurs se consacrent exclusivement aux chèvres pour un effectif total de plus de 11 500 animaux. Les petits ruminants sont conduits à l'attache pour 51% et parqués pour 46% (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/mayotte-665>).

3.11. Le Mouton

Ovis aeries Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Bovidae

Région d'origine : La première domestication du Mouflon d'Asie mineure (*Ovis orientalis*) aurait eu lieu dans la région qui s'étend de la Turquie à l'Iran et se situerait autour de 6000 ans avant JC.

Introduction à La Réunion : Non documentée.

Introduction à Mayotte : Non documentée.

Statut de l'élevage à La Réunion : La structuration de la filière ovine est assez récente sur l'île, elle compte actuellement 143 producteurs et 600 brebis reproductrices (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

Statut de l'élevage à Mayotte : Avec à peine 1100 animaux au total, le cheptel de moutons mahorais est dix fois moins important que celui des caprins (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/mayotte-665>).

3.12. Le Cochon

Sus scrofa Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Suidae

Région d'origine : Le Cochon est issu de la domestication du sanglier d'Eurasie qui a d'abord eu lieu au Proche-Orient (Turquie), vers 8500-8200 avant JC.

Introduction à La Réunion : 1629 [430].

Introduction à Mayotte : IX^e-XI^{ème} siècle.

Statut de l'élevage à La Réunion : La filière "viande porcine" regroupe 305 éleveurs et compte 7000 truies reproductrices (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

Statut de l'élevage à Mayotte : Elevage porcin quasi inexistant.

3.13. Le Petit Molosse de La Réunion

Mormopterus francoismoutoui Goodman, Jansen van Vuuren, Ratrimomanarico, Probst et Bowie, 2008

Ordre : Chiroptera ; Famille : Molossidae

Nom vernaculaire anglophone : Free-tailed bat

Région d'origine : Endémique de La Réunion [432].

Description : Petite chauve-souris dont la longueur totale moyenne est de 93,4 mm (longueur moyenne de la queue 40,2 mm) et la masse moyenne de 6,0 g [432].

Eléments d'écologie : Chauve-souris insectivore, *M. francoismoutoui* vit en colonies pouvant atteindre plusieurs milliers d'individus (*observation personnelle*). Le Petit Molosse de La Réunion niche dans différents milieux, anthropophiles ou sauvages, les gîtes possibles sont nombreux : toitures, derrière un volet, sous les ponts, grottes, fissures de falaises... Les mises-bas (un petit par femelle par an) ont lieu dans la deuxième moitié du mois de décembre [433] au sein de colonies dites "de maternité", composée uniquement de femelles et des jeunes.

Absent à Mayotte.

3.14. La Roussette

Pteropus seychellensis comorensis Nicoll, 1908

Ordre : Chiroptera ; Famille : Pteropodidae

Noms vernaculaires anglophones : Flying-fox, Fruit bat

Noms mahorais : Ndrema, Fanihi

Région d'origine : *P. seychellensis* est retrouvée sur l'ensemble de l'archipel des Comores, à Mayotte, sur l'île de Mafia (Tanzanie) ainsi qu'aux Seychelles (<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/18759/0>).

Description : Grande chauve-souris brun foncé à collier roux. Poids moyen des femelles : environ 350 g ; poids moyen des mâles : environ 410 g ; Longueur du corps : 170-175 mm (*Desvars et al., données non publiées*).

Eléments d'écologie : Très commune à Mayotte, à activité nocturne mais aussi diurne, les Roussettes se nourrissent de fruits, nectars, feuilles, fleurs et pollen. Elles jouent un rôle important dans la pollinisation de certaines espèces. Les *Pteropus* ne possèdent pas d'organe

d'écholocation [434] et s'orientent à la vue. Elles se rassemblent en dortoir de quelques dizaines d'individus.

Absente à La Réunion.

3.15. Le Lémur brun

Eulemur fulvus É. Geoffroy, 1796

Ordre : Primates ; Famille : Lemnidae

Nom vernaculaire anglophone : Common brown lemur

Noms mahorais : Komba, Ankomba

Région d'origine : Endémique de Madagascar, introduit à Mayotte [435].

Description : Lémurien de couleur marron. Le mâle est en général plus foncé que la femelle.

Le poids moyen des mâles adultes est de 2,05 kg, tandis que celui des femelles est de 1,8 kg (*Desvars et al., données non publiées*).

Éléments d'écologie : Les Lémuriens sont surtout arboricoles, mais peuvent descendre à terre (*observation personnelle*). Le régime alimentaire est frugivore et folivore.

Absent à La Réunion.

4. Matériels et Méthodes

4.1. Capture des animaux et prélèvement du matériel biologique

La Réunion : Toutes les captures d'animaux à La Réunion et leurs prélèvements ont été conduites par A. Desvars⁹ entre le 12 février 2009 et le 20 août 2009. Des captures et autopsies de rats ont en plus été conduites entre le 16 et le 20 mai 2010 (mission Life Plus¹⁰).

⁹ Pour les captures de microchiroptères, nous avons bénéficié de l'appui des personnes suivantes : Eric Buffard (Brigade de la Nature Océan Indien/Office Nationale de la Chasse et de la Faune Sauvage), Bérangère Buffard, Thomas Duval, Stéphane Roué (chiroptérologue).

Pour certaines nuits de captures de rongeurs, nous avons bénéficié de l'aide des personnes suivantes : Thomas Hüe, Thomas Duval, Sébastien Boyer, Ben Warren, l'équipe du CIRAD Forêt et Michel Pascal (INRA) dans le cadre du projet Life Plus.

Les captures de tangués ont été réalisées par les chasseurs licenciés de la Fédération de Chasse de La Réunion, qui ont accepté de céder à titre gracieux quelques animaux chassés. La collaboration active de Roselyne Baronce a été essentielle dans la réussite de ces captures.

Mayotte : Les captures et prélèvements sur les animaux de Mayotte ont été conduits entre le 29 mars et le 13 mai 2007 dans le cadre du projet de recherche ChikAni porté par l'INRA. Les prélèvements ont été effectués par trois vétérinaires¹¹.

4.1.1. Micromammifères

Les rats, souris et musaraignes ont été capturés en milieu naturel grâce à des pièges-trappes (ratières Manufrance[®] pour les rats ; souricières INRA pour les souris et musaraignes, (**Figure 18**). Les tangués ont été capturés par les chasseurs de la Fédération de Chasse de La Réunion lors de la période autorisée de chasse (15/02/2009-15/04/2009).

Les euthanasies des micromammifères ont été conduites par administration d'une dose létale de pentobarbital (Doléthal[®]) par voie intra-péritonéale. Pour chaque animal, l'autopsie a été faite immédiatement après la mort : prise de sang (intra-cardiaque et sur buvard¹²), prélèvements des deux reins et prélèvements d'urine par voie intra-vésicale avec une seringue à insuline montée.

Pour les souris, musaraignes et quelques rats, il a été parfois impossible d'obtenir une quantité de sang suffisante par prélèvement intra-veineux ou intra-cardiaque. Pour ces animaux, seul un prélèvement de sang total sur buvard (Whatman 903 Protein Saver Card[®],

Figure 19) a été fait (noté "buvard" dans le **Tableau 12**).

¹⁰ Ces captures ont été faites dans le cadre de l'«Étude de l'état initial de conservation des zones à restaurer et à reconstituer» du programme européen Life Plus. L'étude a été réalisée par Michel Pascale (INRA), assisté sur le terrain par Eric Riviere, Gérard Lebreton, Emilie Lesseguince, Tiana Madaule (CIRAD) et Amélie Desvars.

¹¹ A. Desvars, T. Duval et C. Punelle.

¹² Le sang prélevé sur buvard n'a pas été analysé au cours de ce travail de thèse.



Figure 18 : Poste de piégeage composé d'une souricière INRA et d'un piège Manufrance®.

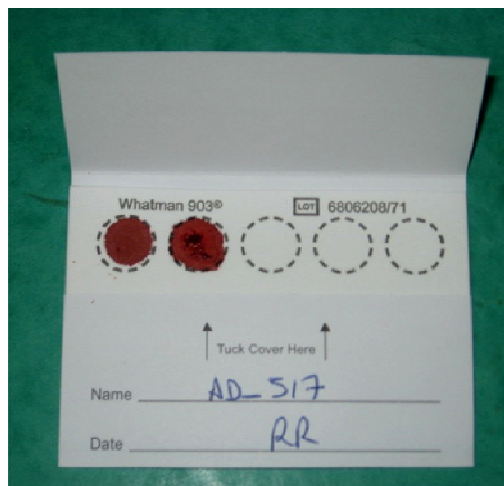


Figure 19 : Prélèvement sanguin sur buvard.

4.1.2. Carnivores errants

A La Réunion, les carnivores errants (chiens et chats) ont été prélevés à la fourrière lors de l'euthanasie faite par le vétérinaire sanitaire (injection intra-veineuse d'une dose létale de pentobarbital, Doléthal®).

A Mayotte, les carnivores errants ont été capturés par la Brigade Nature de Mayotte et le lieutenant de loupeterie dans le cadre d'une opération de lutte contre l'errance animale, et prélevés sur le terrain. Les chiens domestiques ont été prélevés par les Dr Doméon et Schuler, vétérinaires praticiens à Mayotte.

La prise de sang a été faite soit avant la mort, à la veine jugulaire ou à la veine céphalique (patte antérieure), soit après la mort à la jugulaire ou par voie intra-cardiaque (jeunes animaux). Les animaux ont été autopsiés immédiatement après la mort et des prélèvements de tissus rénaux et d'urine (par voie intra-vésicale) ont été effectués.

L'échantillon de tissu rénal de 1 cm³ environ, sans distinction de la latéralité, a été prélevé au niveau de la jonction cortico-medullaire (les leptospires étant localisées dans le tube contourné proximal, au niveau du cortex [9]).

4.1.3. Animaux de rente

Les animaux de rente (bovins, cerfs, ovins, caprins et porcins) ont été prélevés sur la chaîne d'abattage à l'abattoir de Saint-Pierre de La Réunion.

Sur la chaîne d'abattage des bovins et cerfs, les organes thoraciques (poumons, cœur, foie) d'une part, et les reins d'autre part, passent sur une chaîne "abats" parallèle à celle des carcasses. Les prélèvements de reins ont été conduits sur cette chaîne "abats" et la prise de sang a été faite directement dans le cœur.

Pour les caprins, ovins et porcins, la prise de sang a été faite à la veine jugulaire lors de la saignée. Les échantillons de tissus rénaux ont été prélevés directement sur les carcasses avant la pesée.

Prélèvements de tissus rénaux : voir carnivores domestiques.

4.1.4. Microchiroptères

Les chiroptères (*Mormopterus francoismoutoui*) ont été capturés au filet (filet japonais Bonardi 110 D, nylon, maille 16 mm, longueur 12 mètres, 5 poches) et prélevés dans l'heure suivant la capture.

La veine humérale est piquée à l'aide d'une aiguille et un prélèvement de sang total sur buvard a été fait. Cette espèce étant une espèce protégée, il était primordial que le prélèvement sanguin soit bénin afin de relâcher les individus capturés dans les meilleures conditions¹³, nous avons donc préféré faire des prélèvements sanguins minimum sur ces animaux, en utilisant la méthode sur buvard.

Les prélèvements individuels d'urine ont été conduits immédiatement après la capture, sur l'animal en main : un prélèvement d'urine au niveau du méat urinaire externe a été fait avec un écouvillon en rayonne stérile. Des échantillonnages poolés ont aussi été effectués grâce à l'utilisation d'une bâche plastique posée deux heures sous la colonie. Les urines ont ensuite été collectées par écouvillonnage ("pool d'urine").

¹³ Le prélèvement sanguin (en ml), pour être sans danger, ne doit pas dépasser 1% du poids corporel total (en g). Le poids moyen de *Mormopterus francoismoutoui* étant de 5-6 grammes, pour que le prélèvement reste sans danger, il ne doit pas dépasser 60 µl.

4.1.5. Roussettes (Mayotte)

Les roussettes (*Pteropus seychellensis*) ont été capturées au filet (filets japonais Bonardi 110 D, nylon, maille 16 ou 19 mm, longueur 12 mètres de long, 2,4 mètres de hauteur, 5 poches ou filet japonais Ecotone 110 D, nylon, maille 45 mm, 12 mètres de long, 3,2 mètres de hauteur, 4 poches), monté sur des perches à 7 mètres de hauteur environ [436].

Les filets étaient posés vers 16h00 (heure correspondant à une augmentation de l'activité des *Pteropus*) sur un site d'alimentation de hauteur compatible avec la hauteur des perches. Une fois démaillés, les animaux piégés étaient mis dans un panier en osier (80 cm de diamètre, 60 cm de hauteur) fabriqué à cet effet, en attendant d'être prélevés et relâchés. Au cours de la phase de captivité, les animaux étaient hydratés (vaporisation d'eau sur le pelage).

Le prélèvement sanguin (environ 1 ml) a été conduit à la veine humérale, après désinfection de la zone de ponction. La compression du point de ponction à l'aide d'un coton a permis l'hémostase.

Les animaux prélevés ont été marqués visuellement (rasage d'une zone de poils en région cervicale) avant d'être relâchés afin d'éviter qu'un animal soit prélevé deux fois.

4.1.6. Lémuriens (Mayotte)

Les captures ont été faites par télé-anesthésie¹⁴ grâce à la collaboration de la Brigade Nature de Mayotte. L'association tilétamine-zolazépam (Zolétil®) à la dose moyenne de 8 mg.kg⁻¹ a été utilisée. Les animaux fléchés étaient réceptionnés au filet par deux personnes. Si les animaux étaient trop superficiellement endormis, 0,2 à 0,25 ml (demi-dose) de produit anesthésique a été réinjecté en cours de manipulation.

Avant toute manipulation des animaux, une noisette de gel oculaire (Ocrygel®) a été posée sur la cornée afin de la protéger. Le site d'impact de l'aiguille d'anesthésie a été désinfecté avec de la Vétédine® Solution. Pour chaque lémurien le poids et le sexe ont été relevés. Les prises de sang ont été effectuées dans la veine jugulaire, après rasage et désinfection à l'alcool du site de ponction. Pour chaque individu, la quantité de sang prélevée était de 3 à 3,5 ml.

¹⁴ Fusil modèle JM spécial DAN-INJECT / Seringues hypodermiques 1,5 ml (Vétal).

Au cours de la phase d'anesthésie, les fonctions vitales (fréquence cardiaque, fréquence respiratoire et température corporelle) ont été contrôlées. Les animaux prélevés ont été marqués visuellement (rasage d'une zone circulaire au niveau des poils de la queue). Après la manipulation, les animaux étaient mis en cage de réveil et étaient relâchés après réveil complet et sur le site même de leur capture.

4.1.7. Analyse semi-quantitative des urines par bandelettes urinaires

Lorsque la quantité d'urines prélevée le permettait une analyse des urines par bandelette Siemens, Multistix[®] 8 SG a été réalisée sur les rats, tanguis, chiens et chats de La Réunion. L'analyse par bandelette permet de rechercher dans les urines la présence de protéines, de sang, de leucocytes, de nitrites, de glucose, et de corps cétoniques (acide acétique). Elle permet aussi d'évaluer le pH et la densité urinaire.

4.1.8. Zonage : Est versus Ouest (La Réunion)

Etant admis que la majorité des cas humains de leptospirose apparaissent dans l'est de l'île [75, 88, 201] et que l'incidence de la maladie est corrélée positivement avec la pluviométrie, nous avons voulu tester si cette observation était retrouvée chez les animaux. Pour cela, nous avons considéré :

- Partie ouest de l'île : zone située à l'ouest de l'isohyète 2000 mm de pluie par an (isohyète passant par Vincendo dans le sud, et passant entre Sainte-Suzanne et Sainte-Marie dans le nord, **Figure 20**) ;
- Partie est de l'île : zone à l'est de cet isohyète, comptant plus de 2000 mm de pluie par an.

A chaque animal prélevé nous avons attribué une zone en fonction de la commune de capture (animaux sauvages) ou de localisation de son élevage d'origine (animaux de rente).

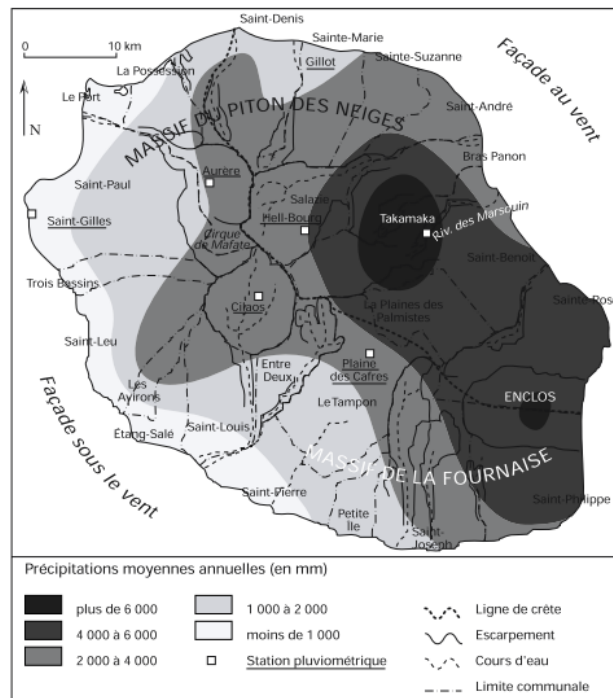


Figure 20 : Île de La Réunion : carte des précipitations moyennes annuelles [437].

4.2. Traitement des échantillons et des données collectées

Une fois collecté, le sang était centrifugé et le sérum était prélevé et congelé à -80°C .

Une fois secs, les buvards ont été conservés à température ambiante.

Les urines ont été neutralisées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) volume à volume, immédiatement après le prélèvement [438] et congelées à -80°C .

Les écouvillons des prélèvements d'urines de chiroptères ont été transportés dans un milieu de transport classique, fabriqué au laboratoire du GHSR, vortexés et congelés à -80°C en l'état en attendant l'extraction.

Les données épidémiologiques collectées sur le terrain ou lors des autopsies ont été relevées sur des fiches de terrain dédiées. Toutes les informations concernant les animaux prélevés et les sites de prélèvement ont été rentrées dans une base de données Access[®].

4.3. Aspects réglementaires

4.3.1. La Réunion

4.3.1.1. *Espèce protégée*

Mormopterus francoismoutoui est une espèce protégée à La Réunion. Les textes juridiques de référence concernant la protection de cette espèce sont les suivants :

- Protection des chauves-souris en Europe : Décret no 96-202 du 11 mars 1996 portant publication de l'accord relatif à la conservation des chauves-souris en Europe (J.O n° 65 du 16 mars 1996).
- Liste des espèces animales protégées à La Réunion : Arrêté du 17 février 1989 fixant des mesures de protection des espèces animales représentées dans le département de La Réunion (J.O du 24/03/1989).

Une autorisation de capture-manipulation et relâcher sur place a été obtenue auprès de la Direction de l'Environnement, DIREN (avec l'accord du Centre National de Protection de la Nature, CNPN, **Annexe C**).

4.3.1.2. *Espèce gibier*

Le Tangué, *Tenrec ecaudatus*, étant une espèce gibier (cf. Arrêté du 25 août 2008 fixant la liste des espèces de gibier dont la chasse est autorisée sur le territoire du département de La Réunion), le prélèvement d'individus en milieu naturel est réglementé par :

- L'Arrêté préfectoral n°1268 du 30 mai 2008 (fixant la période de chasse du 15 février au 15 avril 2008) ;
- L'Arrêté du 17 mars 2008 modifiant l'arrêté du 7 juillet 2006 portant sur l'introduction dans le milieu naturel de grand gibier ou de lapins et sur le prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée ;
- L'Article 424.11 du Code de l'Environnement notifiant que « *l'introduction dans le milieu naturel de grand gibier et de lapins, et le prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée sont soumis à autorisation préfectorale, dans des conditions et selon des modalités*

fixées par un arrêté conjoint du ministre chargé de la chasse et du ministre chargé de l'agriculture ».

Après soumission à l'accord de la Fédération de Chasse de La Réunion, une autorisation de capture et de prélèvements dans le milieu naturel de tangles a été accordée par la Direction de l'Agriculture et la Forêt (DAF) pour le projet de recherche (suite à demande spécifique, **Annexe D**).

4.3.1.3. Autorisation d'expérimenter sur animaux vivants

Les textes juridiques relatifs à l'expérimentation animale sont les suivants :

- Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux (JORF du 27/04/88) ;
- Articles R.214.87 à R.214.130 du Code Rural.

Un dossier de demande d'expérimenter sur animaux vivants a été constitué et présenté auprès de la Direction des Services Vétérinaires qui y a donné une suite favorable.

4.3.2. Mayotte

4.3.2.1. Espèces protégées

Le Lémur brun et la Roussette sont des espèces protégées à Mayotte. Ainsi, leur capture a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès du Préfet et de la Direction de l'Agriculture et la Forêt (DAF) de Mayotte. L'arrêté préfectoral n°029/DAF/sef/2007 nous a autorisé la capture, les prélèvements et le relâcher sur place de ces deux espèces (**Annexe E**).

Eulemur fulvus est listé en Annexe I de la Convention de Washington (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES), tandis que *Pteropus seychellensis* appartient à l'Annexe II. Des permis d'importation vers La Réunion et d'exportation vers la métropole ont été obtenus pour le transport des échantillons (permis d'importation n°FR0797400112-I et FR0797400111-I délivrés le 16 avril 2007, et permis d'exportation n°FR0797600003-E et FR0797600004-E délivrés le 16 Octobre 2007, pour les lémuriens et les roussettes respectivement, **Annexes F et G**).

4.3.2.2. Chiens errants

L'arrêté préfectoral n°005/CAB/2007 portant régulation administrative des populations de chiens errants a permis d'effectuer des prélèvements sur ces animaux (**Annexe H**).

4.4. Sérologie par test de micro-agglutination (MAT)

La présence d'anticorps sériques anti-*Leptospira* a été recherchée par la procédure standard du test d'agglutination microscopique (MAT) [9].

Pour les sérums des animaux de La Réunion, dix-sept souches pathogènes de référence et une souche saprophyte (*L. biflexa*) ont été utilisées comme antigènes (**Tableau 7**).

Pour les sérums des animaux de Mayotte, nous avons utilisé onze souches, dont deux souches de références et neuf souches isolées chez des patients à l'hôpital de Mamoudzou [74, 228].

Les souches ont été cultivées en milieu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) à 29°C, à l'obscurité et utilisées comme antigènes lorsque les cultures étaient âgées de 7-10 jours. Dans un premier temps nous avons fait un screening des sérums à la dilution 1:50. Les sérums montrant une agglutination à cette dilution ont ensuite été dilués au demi et testés pour des dilutions allant de 1:100 à 1:12800. Nous avons considéré un seuil de positivité de 1:100 pour toutes les espèces. Pour les sérums présentant des réactions d'agglutination positives à plus d'un antigène, les titres inférieurs d'au moins deux dilutions à la plus forte dilution positive ont été considérés comme des réactions de coagglutination et exclues des analyses ultérieures.

Tableau 7 : Souches en culture (milieu EMJH) utilisées pour les analyses sérologiques et raisons d'inclusion dans le panel pour la sérologie.

(Toutes les souches ont été fournies par l'Institut Pasteur de Paris).

No	Espèces	Sérogroupe	Sérovars	Souches de référence	Origine	Source	Raisons du choix
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico	Australie	Humain	Retrouvé fréquemment chez les animaux [407, 439, 440, 441], commun chez les rongeurs en Asie [442]
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	Japon	Humain	Retrouvé fréquemment chez les animaux [439, 443, 444]
3	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van tien	Indonesie	Humain	Fréquent chez les rongeurs en Thaïlande [445], très présent chez les patients en Asie du Sud-Est [446]
4	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrech IV	Hollande	Chien	Associé à la leptospirose du chien dans le monde entier
5	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3	Espagne	Mulot gris	Souris considérée comme réservoir de ce sérovar [73]
6	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C	Indonesie	Chauve-souris	Chauves-souris considérées comme réservoir de ce sérovar [73]
7	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	URSS	Humain	Le raton-laveur est considéré comme réservoir de ce sérovar [73], retrouvé chez les chiens en Amérique du Nord et Europe [334]
8	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo (hardjobovis)	Sponselee	Hollande	Bovin	Bovins considérés comme réservoir de ce sérovar [73]
9	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	Japon	Humain <i>via</i> un cochon d'Inde	Commun chez les bovins, notamment en Asie [442]
10	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhagani	Wijnberg	Hollande	Humain	Classiquement responsable de la maladie de Weil, commun chez <i>Rattus</i> [442]
11	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K	Panama	Opossum	Représentant de l'espèce <i>L. noguchii</i>
12	<i>L. biflexa</i>	Semarranga	Patoc	Patoc 1	Italie	Eau	Généralement inclus dans le panel pour le MAT (réactions croisées avec les sérogroupe pathogènes)
13	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona	Australie	Humain	Porcs et bovins considérés comme réservoirs de ce sérovar [73]
14	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	Indonesie	Humain	Retrouvé fréquemment chez les animaux [440]
15	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84	Danemark	Souris	Bovins considérés comme réservoir de ce sérovar [73]
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin	URSS	Humain	Porcs considérés comme réservoir de ce sérovar [73], retrouvé aussi chez le chien en Amérique du Sud [443]
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun	France	Humain	Responsable de leptospirose humaine
18	<i>L. kirschneri</i>	Mini	Borincana/Unipertama/Hebdomadis	200801925	Mayotte	Humain	Sérovar circulant à Mayotte chez l'homme [74], représentant du séroroupe Mini.

Tableau 8 : Souches utilisées pour le MAT sur les sérums des animaux de Mayotte [228].

Nom de la souche ⁽¹⁾	Espèce	Sérogroupe	Sérovar possible	Sequence type (ST) définie par MLST [228]	Origine
200701203	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Beye/Mini	ST1	Mayotte (Homme)
200901118	<i>L. borgpetersenii</i>	Pomona	Mozdok	ST10	Mayotte (Homme)
201001127	<i>L. borgpetersenii</i> group B	Pyrogenes	?	ST5	Mayotte (Homme)
200901122	<i>L. borgpetersenii</i> group B	Pyrogenes	Kenya	ST5	Mayotte (Homme)
201001125	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	?	ST2	Mayotte (Homme)
200901489	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes/Camlo/Robinsoni	ST2	Mayotte (Homme)
Wijnberg	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	/	Hollande (Homme)
Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	/	Hollande (Chien)
200803703	<i>L. kirschneri</i>	Mini	Borincana/Unipertama/Hebdomadis	ST9	Madagascar (Homme)
201001128	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	?	ST13	Mayotte (Homme)
200801774	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	ST6	Mayotte (Homme)

(1) Toutes les souches utilisées, isolées chez des patients à Mayotte, appartiennent à la collection de l'Institut Pasteur de Paris.

4.5. Extraction

L'extraction d'ADN total à partir des échantillons a été conduite à partir de 20-25 mg de tissu rénal pesé, ou 100 µl d'urines+PBS (parfois moins pour les urines de souris ou musaraignes), avec le kit d'extraction manuel Qiagen Dneasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fabricant.

Afin de déterminer la présence d'inhibiteurs au sein des échantillons biologiques et afin d'identifier les faux négatifs, un contrôle interne (CI) a été construit (voir ci-dessous). Lors de l'étape d'ajout de la protéinase K, nous avons ajouté 10 µl du CI, à la concentration déterminée comme optimale, qui a ensuite été co-extrait avec l'ADN de l'échantillon.

4.6. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

4.6.1. Définitions

Pour la mise au point de la PCR en temps réel sur le LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) nous avons suivi les recommandations du "*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines*" [447, 448].

Conformément au MIQE, nous utiliserons les termes suivants [448] :

- qPCR : real-time quantitative PCR ou PCR quantitative en temps réel,
- Cq : pour cycle de quantification (aussi appelé Cp pour *crossing point* ou Ct pour *threshold cycle*).

4.6.2. Présentation de LipL32

Découverte il y a un peu plus de 10 ans, LipL32, lipoprotéine de 32 kDa [42], aussi connue sous le nom de haemolysis associated protein 1, Hap1 [39], est exposée à la surface bactérienne (**Figure 21**) [42, 449]. LipL32 est la protéine de surface la plus abondante chez les leptospires pathogènes et représente 75% des protéines de la membrane externe [450]. Cette lipoprotéine est hautement conservée parmi les leptospires pathogènes, avec 96,9%

d'identité entre les séquences d'ADN, alors qu'il n'existe aucun gène orthologue chez les espèces saprophytes [38, 39, 42, 43, 449].

LipL32 est un des antigènes les plus immunogènes reconnu par le système immunitaire humain lors d'infection naturelle [42, 48, 451] et la protéine LipL32 est fortement impliquée dans la pathogenèse de la néphrite tubulo-interstitielle observée lors d'infection [452]. LipL32 est également considérée comme une protéine candidate pour la mise au point de vaccins contre la leptospirose [453, 454, 455, 456]

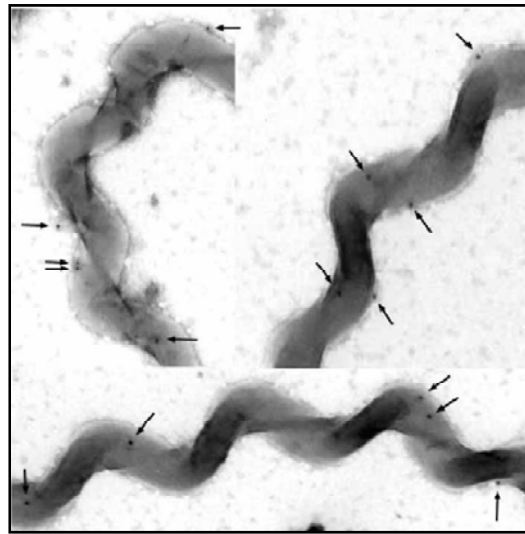


Figure 21 : Microscopie électronique après immunomarquage de la protéine LipL32 par antisérum anti-LipL32 à l'or colloïdal à la surface de *L. kirschneri*.
(les flèches indiquent la localisation des molécules de LipL32 ainsi mises en évidence) [449]

Levett *et al.*, [149] ont utilisé pour la première fois le gène *lipL32* pour le diagnostic de l'infection leptospirosique, et un fragment de 423 pb, localisé entre les positions 270 et 692 du gène codant pour LipL32, a servi de cible pour la PCR en temps réel (technologie SYBR Green). Le gène *lipL32* a été la cible de différentes PCR classiques [457, 458] et il a aussi été utilisé pour la mise au point de PCR nichées [459, 460] avec de bons résultats de spécificité et de sensibilité pour le diagnostic de routine.

En 2009, Stoddard *et al.*, [150] publient une technique de qPCR en technologie TaqMan visant un fragment de 242 pb du gène *lipL32*. La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 20 génomes équivalents par réaction, la méthode de détection est spécifique des leptospires pathogènes et applicable sur des échantillons biologiques [150]. Cette technique a été utilisée dans notre étude pour la mise en évidence de génomes de *Leptospira* pathogènes dans nos échantillons.

4.6.3. Construction d'un contrôle positif et d'un standard pour la PCR quantitative

Afin de quantifier l'ADN de *Leptospira* présent dans chaque échantillon de tissu rénal, nous avons cloné la séquence cible de 242 pb du gène codant pour LipL32 de *L. interrogans* sérovar Copenhageni strain Wijinberg dans un vecteur plasmidique pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, Madison, WI).

La méthode consiste à amplifier par PCR conventionnelle un fragment spécifique de *L. interrogans* sérovar Copenhageni strain Wijinberg cultivé en milieu EMJH, en utilisant les amorces LipL32-45F/LipL32-286R (**Tableau 9**) [150]. Le fragment amplifié a ensuite été ligué dans le vecteur pGEM[®]-T en suivant les instructions du fabricant, et des cellules JM109 de *Escherichia coli* ont été transformées avec ce plasmide. Le plasmide a ensuite été extrait d'*E. coli* en culture en milieu liquide. Des dilutions en série de l'ADN plasmidique ont été réalisées jusqu'à 10^{-12} et considérées comme standard afin d'évaluer la sensibilité de la PCR quantitative et pour la construction de la courbe standard pour la quantification de l'ADN génomique de *Leptospira*.

La quantification de l'ADN a été faite avec le kit QuantIt[™] PicoGreen[®] (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) sur le LightCycler 2.0 System (Roche, Meylan, France).

4.6.4 Construction d'un contrôle interne (CI) – Prélèvements de La Réunion

Afin de contrôler la réussite de l'étape d'extraction et de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les échantillons biologiques, nous avons choisi un CI devant répondre aux critères suivants :

- Être utilisable pour les 13 espèces de mammifères étudiées ;
- La séquence ADN du CI devait être différente de séquences ADN de pathogènes connus chez les animaux ;
- La séquence ADN du CI ne devait pas avoir d'homologies avec une séquence d'ADN de *Leptospira*.

Par conséquent, pour les animaux de La Réunion, nous avons choisi une séquence de 63 pb du gène codant pour l'ADN polymérase du Varicella-Zoster Virus (VZV) isolé chez un

patient au GHSR. Cette séquence a été clonée dans un vecteur pGEM[®]-T Vector (Promega, Madison, WI), en utilisant les amorces VZV UP/VZV DP (**Tableau 9**) [461].

Afin d'identifier la concentration optimale de plasmide VZV à utiliser dans la qPCR, nous avons fait des dilutions en série du plasmide extrait (10^{-1} à 10^{-12}) et les avons testées par qPCR. La concentration optimale à ajouter dans chaque échantillon est celle pour laquelle l'IC est toujours détectable dans les échantillons négatifs.

4.6.5. Détection du génome de *Leptospira* par qPCR

Nous avons utilisé les amorces spécifiques des *Leptospira* pathogènes [150, 462] LipL32-45F/LipL32-286R visant un fragment de 242 pb sur le gène LipL32 et la sonde d'hydrolyse LipL32-189P décrites par Stoddard *et al.* [150] (**Tableau 9**).

Les qPCR ont été conduites sur le LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les concentrations en amorces et en sonde ainsi que les conditions d'amplification ont été optimisées afin d'obtenir la meilleure sensibilité.

Le protocole d'amplification était le suivant :

- Dénaturation initiale à 95°C, pendant 8 minutes,
- 55 cycles à 95°C pendant 10 secondes, puis 58°C pendant 15 secondes,
- Refroidissement à 40°C, pendant 30 secondes.

Les concentrations finales des réactifs étaient les suivantes : 0,4 µM pour chaque amorce, 0,13 µM de sonde d'hydrolyse, 1X LightCycler[®]480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France), et 2,5 µl d'extrait d'ADN, dans un volume de réaction total de 10 µl.

Pour chaque échantillon, la qPCR a été répétée 2 fois. Nous considérons un échantillon comme positif si son Cq est compris entre 5 et 40 cycles (40 est le Cq maximal obtenu pour un échantillon positif à la dernière dilution permettant d'obtenir un résultat positif). Dans chaque run, nous incluons un puit témoin positif (mix + plasmide contenant *lipL32*), et un puit témoin négatif (mix + eau PCR-grade).

4.6.6. Détection du contrôle interne (CI) par qPCR

4.6.6.1. Prélèvements de La Réunion

Nous avons recherché la présence d'ADN amplifiable dans les échantillons négatifs afin de rechercher la présence d'éventuels inhibiteurs de la PCR. Pour cela, nous avons amplifié le fragment cloné du CI (Varicella-Zoster Virus) grâce aux amorces VZV UP/VZV DP associés à la sonde d'hydrolyse VZV P (**Tableau 9**) [461]. La qPCR a été conduite sur le LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le protocole d'amplification était le suivant :

- Dénaturation à 95°C, pendant 8 minutes,
- Touch down de 10 cycles à 95°C, pendant 15 secondes, puis 60°C, pendant 30 secondes,
- 45 cycles à 95°C pendant 15 secondes, puis 65°C pendant 30 secondes,
- Refroidissement à 40°C, pendant 30 secondes.

Les conditions de réaction étaient les suivantes : 0,25 µM de chaque amorces, 0,10 µM de sonde d'hydrolyse, 1X LightCycler[®]480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France), et 2,5 µl d'extrait d'ADN, dans un volume de réaction total de 10 µl.

4.6.6.2. Prélèvements de Mayotte¹⁵

Pour les prélèvements rénaux de rats de Mayotte, nous avons utilisé le gène codant pour la GAPDH comme contrôle interne. Les amorces utilisées étaient les amorces hamster GAPDH C/D, qui amplifient un fragment de 250 pb sur le gène de ménage GAPDH (**Tableau 9**) [463]. Les produits d'amplification ont ensuite été visualisés par révélation au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

¹⁵ Ces analyses ont été conduites au cours du stage à l'Institut Pasteur de Paris.

Tableau 9 : Amorces et sondes utilisées pour les qPCR.

Cible	Amorce ou sonde d'hydrolyse ^a	Séquence (5' to 3')	Ref.
Gène codant pour LipL32 <i>Leptospira</i>	LipL32-45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG	[150]
	LipL32-286R	GAAGTCCCATTTTCAGCGATT	
	LipL32-189P	AAAGCCAGGACAAGCGCCG	
Gène codant pour l'ADN polymérase VZV ^b	VZV UP	CGGCATGGCCCGTCTAT	[461]
	VZV DP	TCGCGTGCTGCGGC	
	VZV P	ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC	
Gène codant pour la GADPH de hamster	Hamster GADPH C	TGGTATCGTGGAAGGACTCA	[461]
	Hamster GADPH D	CCTGCTTACCACCTTCTTG	

^a Toutes les sondes ont une terminaison 3' FAM et une terminaison 5' TAMRA.

^b Numéros d'accension Gene bank : AB059828-31 et X04370.

4.7. Culture de tissu rénal et d'urines sur milieu EMJH (animaux de La Réunion)

La mise en culture des tissus rénaux ou des urines a, pour chaque animal, été effectuée dans les quatre heures suivant l'euthanasie. A cause des contraintes de terrain, la méthode de culture a été différente pour les carnivores domestiques (cultures faites en 2009) et pour les rongeurs (cultures faites en 2010).

Carnivores domestiques : sous un poste de sécurité microbiologique, un morceau de tissu rénal d'environ 1 cm³ est préalablement broyé à l'intérieur du tube d'une seringue (2 ou 5 ml) à l'aide du piston. Puis, un échantillon de la taille d'un petit pois est de nouveau broyé mécaniquement à l'aide d'un broyeur (Mixer Mill MM 301, Retsch GmbH) en présence d'1 ml de milieu de culture EMJH (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) et de deux billes de verre stériles. Le liquide obtenu est alorsensemencé dans un milieu de culture EMJH et mis à l'étuve à l'obscurité à 29°C.

Rats noirs : Juste après le prélèvement, un rein est broyé à l'intérieur du tube d'une seringue (2 ml) à l'aide du piston etensemencé directement dans un milieu de culture EMJH qui est ensuite mis à l'étuve à l'obscurité à 29°C.

Lorsque la vessie était pleine, 0,2 à 0,3 ml d'urines a été prélevé stérilement directement dans la vessie à l'aide d'une seringue à insuline montée etensemencé immédiatement dans un milieu de culture EMJH.

Afin de rechercher la présence de leptospires, les cultures ont été examinées chaque semaine au microscope à fond noir, pendant quatre mois, délai après lequel, si aucun leptospire n'était observé, elles étaient considérées comme négatives. Si des leptospires étaient présents, un repiquage de la culture était effectué.

Lorsque des contaminants (coques, bacilles) étaient présents dans les cultures, nous avons filtré le milieu de culture avec un filtre de 0,22 µm [9].

4.8. Analyse des séquences d'ARNr 16S (prélèvements reins de rats noirs de Mayotte)

La séquence codant pour l'ARNr 16S de *Leptospira* permet d'identifier la souche au niveau de l'espèce génomique [464]. Les amplifications et les alignements de séquences ont été conduits par l'équipe de l'Unité de Biologie des Spirochètes de l'Institut Pasteur de Paris. L'ADN a été amplifié de façon classique par Taq polymérase (GE Healthcare). Le gène *rrs* a été amplifié par PCR nichée grâce aux couples d'amorces A/B [145] puis C/RS4 [465] (**Tableau 10**). Le séquençage a été conduit à la plate-forme Génomique des Pathogènes (Institut Pasteur, Paris) sur un séquenceur à capillaires ABI 3730XL (Applied Biosystems) en utilisant le fluorophore Big Dye v1.1 (Applied Biosystems). Les séquences ont ensuite été comparées avec les séquences des souches de *Leptospira* isolées chez des patients à Mayotte [228] ainsi qu'avec les séquences connues publiées dans GenBank, par Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR nichée.

Amorces	Séquences	Références
A	5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'	[145]
B	5'-TTCCCCCATTTGAGCAAGATT-3'	[145]
C	5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3'	[145]
RS4	5'-TCTTAAGTCTGCTGCCCTCCCGT-3'	[465]

Les séquences ont été alignées sous Multalin [466] et MEGA.5 [467] avec le programme MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation) [468]. Le meilleur modèle a été sélectionné grâce au programme JModelTest2 [469] en utilisant le critère d'information d'Akaike (AIC). Enfin, l'arbre a été construit avec le programme FigTree.

4.9. Analyses statistiques (animaux de La Réunion)¹⁶

Toutes les analyses statistiques ont été conduites à l'aide du logiciel R [470].

4.9.1. Comparaison des charges bactériennes rénales

Nous avons cherché à comparer les moyennes des charges rénales entre les espèces en réalisant une analyse de variance et un test de comparaisons multiples des moyennes. Les contraintes à vérifier pour valider l'analyse sont la normalité et l'homogénéité des variances des résidus. Notre démarche a été la suivante :

- Transformation des données brutes de charges bactériennes (x) en $\log(x+1)$;
- Analyse de variance et test de Fisher-Snedecor
- Description graphique de la distribution des résidus (afin de voir si cette distribution se rapprochait de la normalité) ;
- Test d'homogénéité des variances et validation graphique
- Si hypothèses non validées, transformation de Box-Cox sur données pour homogénéiser les variances ;
- test de comparaisons multiples des moyennes si hypothèses validées ;
- Comparaison des résultats avec un test de comparaisons multiples basé sur le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec correction de type Bonferroni ;
- Recherche des facteurs de variations de la charge bactérienne rénale chez le rat noir et la souris.

4.9.2. Facteurs de risque d'infection par *Leptospira*

Différents facteurs de risque ont été testés en fonction des données disponibles pour chaque espèce.

¹⁶ Pour cette partie, les analyses statistiques ont été faites avec la précieuse collaboration d'Aurore Benneveau et de Frédéric Chiroleu.

Pour les rongeurs :

- Espèce,
- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Poids,
- Lieu de capture (est *versus* ouest, en fonction de l'isohyète 2000 mm de pluie par an¹⁷),
- Résultat de l'analyse sérologique.

Pour les musaraignes et les tangués :

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Poids,
- Lieu de capture (est *versus* ouest).

Pour les carnivores errants :

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Lieu de capture (est *versus* ouest),
- Résultat de l'analyse sérologique.

Pour les porcs et les cerfs :

- Poids,
- Résultat de l'analyse sérologique.

(89/90 porcs prélevés sont des truies de réformes. Nous n'avons pas les données de sexe et d'âge pour les cerfs).

Pour les caprins (nous n'avons pas d'information sur l'élevage d'origine pour la majorité des chèvres prélevées) :

- Sexe,
- Poids.

¹⁷ Voir Matériels et Méthodes.

Pour les bovins :

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Poids,
- Nombre de ferme(s) fréquentées (les bovins peuvent circuler dans plusieurs fermes au cours de leur vie. Nous avons testé l'effet du nombre de fermes dans lesquelles l'animal a circulé au cours de sa vie),
- Résultat de l'analyse sérologique.

Aucune étude statistique n'a été faite sur les ovins (seulement cinq individus prélevés) ni sur les chauves-souris (seulement deux positifs).

Les bovins, les caprins et les porcs étant des animaux qui circulent beaucoup entre différents élevages au cours de leur vie, nous avons décidé de ne pas tester l'effet "localisation de l'élevage d'origine" car cette donnée correspond au dernier élevage fréquenté uniquement. De plus, pour ces espèces, les biais liés aux conditions d'élevage sont importants et peuvent faire varier de façon importante les résultats de l'analyse des facteurs de risque. Il conviendra d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats.

L'association des facteurs de risque avec l'infection leptospirosique a été d'abord testée par analyse univariée. Les odds ratio (OR) bruts ont été calculés pour tester l'association entre les variables étudiées et le statut sérologique d'une part, entre les variables étudiées et le statut de porteur rénal d'autre part. Une régression logistique a été utilisée pour tester les interactions entre les variables, afin de déterminer quelles étaient les variables liées. Une sélection ascendante des variables explicatives a été conduite en utilisant le critère d'information d'Akaike (Akaike's Information Criterion, AIC) afin de choisir le meilleur modèle. La performance du modèle a été mesurée grâce au test de Hosmer-Lemeshow (une valeur de $p < 0,05$ indique que le modèle est peu concordant avec la réalité). Toutes les interactions possibles entre les variables ont été testées et retenues dans le modèle si elles étaient statistiquement et biologiquement significatives ($p < 0.05$), et les OR corrigés ont été calculés.

4.9.3. Corrélation entre l'infection rénale et l'analyse semi-quantitative des paramètres urinaires

La même méthodologie a été appliquée à l'étude des résultats des bandelettes urinaires. Nous n'avons pris en compte dans cette seconde étude que les animaux pour lesquels nous avons un résultat d'analyse urinaire (soit 95 animaux). Les facteurs de risque considérés étaient :

- La présence de leucocytes dans les urines,
- La présence de nitrites dans les urines,
- La présence de protéines dans les urines,
- Le pH urinaire,
- La présence de sang dans les urines,
- La densité urinaire,
- La présence de corps cétoniques dans les urines,
- La présence de glucose dans les urines.

CHAPITRE VI

EPIDEMIOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE A LA REUNION

1. Résultats

1.1. Bilan des captures

Toutes les captures et prélèvements ont été conduits entre le 12 février 2009 et le 20 août 2009 ; quelques piégeages de rats ont de nouveau été effectués entre le 16 et le 20 mai 2010. La **Figure 23** présente la répartition des sites de captures; la **Figure 23** illustre quelques lieux où des captures de rats ont été effectuées.

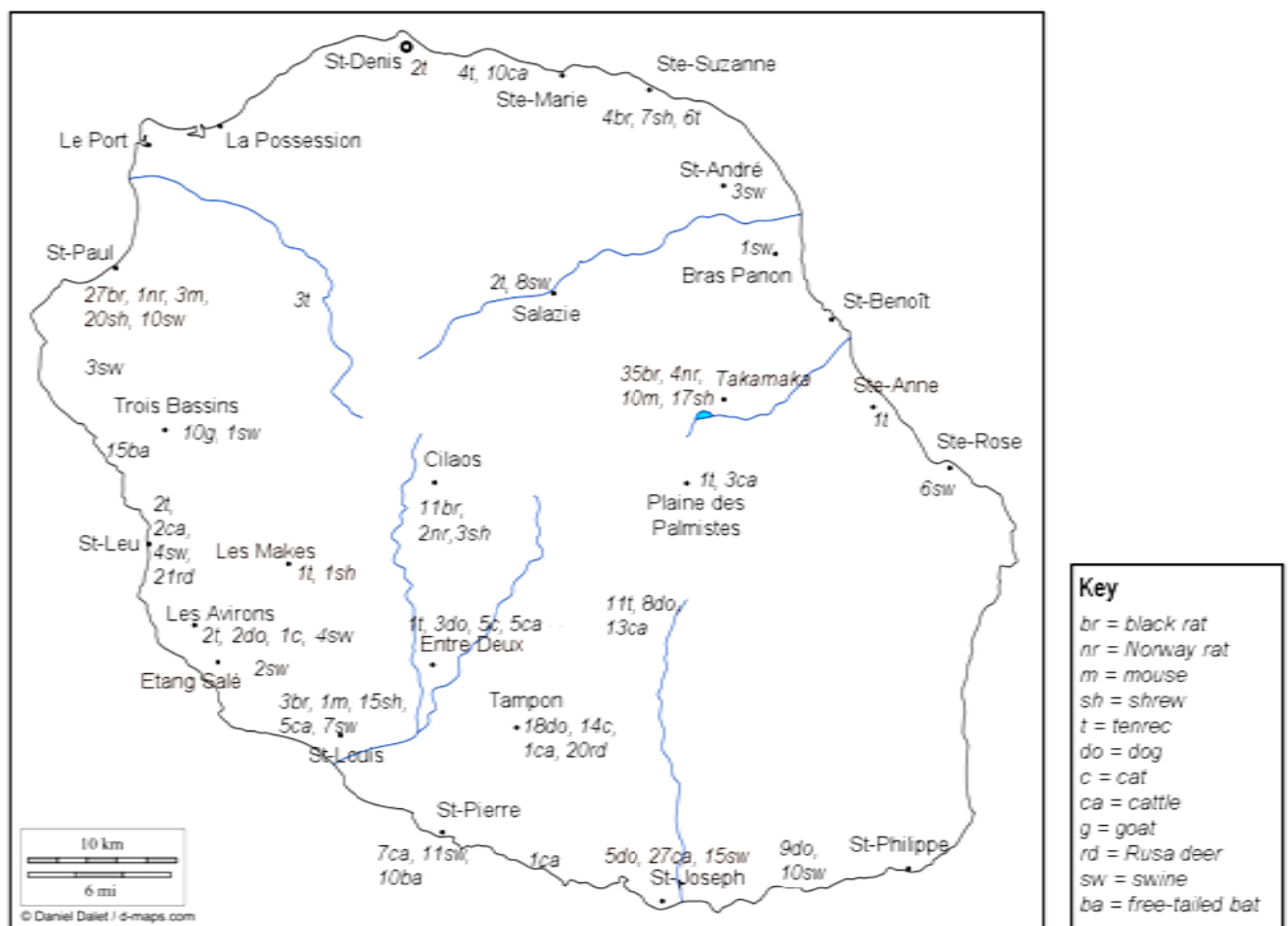


Figure 22 : Lieux de capture des différents animaux étudiés (prélèvements de 2009).
Les données sont manquantes pour 10 chats errants, 17 bovins, 50 chèvres, les 5 moutons prélevés et 2 truies.



Figure 23 : Types d'environnements explorés pour la capture de micromammifères à La Réunion.

A. Exploitation agricole à Takamaka (Hauts de Saint-Benoît) ; **B.** Sainte-Suzanne, champs de canne près du temple tamoul ; **C.** Sainte-Suzanne ; **D.** Ratière posée aux pieds des massifs de bambous ; **E.** Sainte-Suzanne (berges de la rivière) ; **F.** Takamaka : hangar et amoncellement de matériaux (servant de gîtes pour les rongeurs) ; **G.** Takamaka : abri pour les bovins ; **H.** Etang du Gol ; **I.** Etang de Saint-Paul.

Le **Tableau 11** et **Tableau 12** synthétisent les résultats des captures et des prélèvements.

Les résultats de piégeage montrent que les populations de souris et de rats surmulots sont de taille inférieure à celle des rats noirs. A La Réunion, le climat chaud et la présence de divers habitats forestiers complexes, sont favorables au rat noir et lui procurent un avantage significatif sur le rat surmulot, moins à l'aide dans les milieux vericaux [471, 472]. Barbehenn [473] suggère que la musaraigne a été responsable du déclin de la population de souris domestiques sur l'île de Guam (océan Pacifique). Ces deux micromammifères sont sympatriques à La Réunion (*observation personnelle*), c'est pourquoi nous supposons qu'un schéma de compétition similaire a eu lieu à La Réunion, expliquant la faible densité de souris domestiques sur l'île et le peu de piégeages rapportés pour cette espèce.

Les truies reproductrices de réforme représentent 98,8% de la totalité des porcins prélevés (un seul verrat a été prélevé). Nous avons choisi de prélever ces animaux plutôt que les animaux à l'engrais pour deux raisons : a/ la leptospirose ayant des conséquences sur la reproduction, il nous a semblé judicieux d'évaluer la prévalence de la maladie chez les animaux reproducteurs plutôt que chez les jeunes animaux à l'engraissement ; b/ techniquement, il était plus simple pour une personne seule de prélever les truies de réformes car la chaîne d'abattage est plus lente et l'organisation des abattages permettait d'avoir des animaux provenant de nombreux élevages.

Nous n'avons pas d'information concernant le sexe et l'âge des cerfs *Rusa* prélevés à l'abattoir, mais nous savons cependant que les animaux abattus avaient environ le même âge (*observation personnelle*).

L'élevage des ovins est en développement à La Réunion, ces animaux sont principalement sous forme de viande fraîche (en opposition à la viande congelée) pour les fêtes (Aïd el Kebir, fêtes des mères, Pâques) et abattus pour ces occasions seulement, c'est pourquoi nous n'avons que cinq prélèvements sur ovins.

Nous ne rappellerons pas dans ce chapitre les notions exposées dans la **section 1** du **Chapitre IV "Rôle des animaux dans l'épidémiologie de la leptospirose : la notion d'hôte réservoir et d'hôte sensible"**. Le lecteur pourra s'y référer pour mieux comprendre l'interprétation des résultats qui suivent, notamment en ce qui concerne l'interprétation des résultats sérologiques.

Tableau 11 : Animaux prélevés à La Réunion en 2009 et 2010.

En 2010, 37 rats noirs ont été capturés afin d'effectuer des prélèvements de reins et urines pour mise en culture (dans la cadre d'une collaboration avec Michel Pascal pour le projet Life Plus).

Espèce	Nb total	Nb femelles	Nb mâles	Sexe nd	Adultes	Jeunes ^a	Sub-adulte ^b	Age nd	Poids moyen (±écart-type)	Poids min-max	Longueur corps (±écart-type), en mm	Long. corps min-max (mm)	Lieu de capture (faune sauvage) / Lieu de résidence (animaux de rente) avant la mort	Nb par zone ^f
Rat Noir (2009)	80	32	47	1	52	28	0	0	128,2 (±37,81) g	115–202 g	169,96 (±15,66)	115 - 202	Cilaos (11), SteSuzanne (4), StLouis (3), StPaul (27), Takamaka (35)	39 E, 41 O
Rat Noir (2010)	37	18	19	0	na	na	na	0	104,5 (±33,88) g	51 – 193 g	158,46 (±19,55)	21 - 189	Forêt de la Grande Chaloupe (communes de La Possession et StDenis)	37O
Rat Surmulot	7	3	4	0	5	2	0	0	131,1 (±34,54) g	90-170 g	175,28 (±19,03)	150 - 207	Cilaos (2), StPaul (1), Takamaka (4)	4 E, 3 O
Souris	14	6	7	1	10	4	0	0	13,94 (±1,96) g	10,3 -17,5 g	74,14 (±7,67)	62 - 88	StLouis (1), StPaul (3), Takamaka (10)	10 E, 4 O
Musaraigne	62	31	31	0	53	9	0	0	25,2 (±6,33) g	14,6-45 g	97,97 (±12,5)	76 – 150	Cilaos (3), SteSuzanne (7), StLouis (15), StPaul (20), Takamaka (17)	24 E, 38 O
Tenrec	38	25	13	0	20	18	0	0	479,6 (±158,98) g	215–820 g	242,34 (±33,27)	188 – 287	Avirons (2), Entre Deux (1), Maito (3), Les Makes (1), Plaine des Cafres (11), Plaine des Palmistes (1), Salazie (2), StDenis (2), SteAnne (1), SteMarie (4), SteSuzanne (6), StLeu (2)	21 E, 17 O
Chien errant	51	24	27	0	39	11	0	0	na	na	na	na	Avirons (2), Entre Deux (3), Langevin (7), Plaine des Cafres (8), Saint-Joseph (5), Tampon (18), Vincenzo (2), na (6)	22 E, 23 O, 6 na
Chat errant	30	16	14	0	15	13	0	0	na	na	na	na	Avirons (1), Entre Deux (5), Tampon (14), na (10)	20 O, 10 na
Bovin	91 ^c	24	67	0	15 ^d	35 (veaux)	41 ^e	0	245,3 (±118,49) kg	85-472,2 kg	na	na	Entre Deux (5), Petite Ile (1), Plaine des Cafres (13), Plaine des Palmistes (3), SteMarie (10), StJoseph (27), StLeu (2), StLouis (5), StPierre (7), Tampon (1), na (17)	?
Caprin	60	51	9	0	60	0	0	0	16,6 (±5,36) kg	7,4-31,1 kg	na	na	Trois Bassins (10), na (50)	10 O, 50 na
Ovin	5	0	5	0	0	5	0	0	20,7 (±2,342) kg	17,2–23.3 kg	na	na	na (5)	5 na
Cerf Rusa	41	na	na	41	na	na	na	41	26,6 (±2,21) kg	17-46,8 kg	na	na	StLeu (21), Tampon (20)	41 O
Porcin	90	89	1	0	90	0	0	0	189,5 (±34,89) kg	117,2-264,2 kg	na	na	Avirons (4), Bras Panon (1), Etang Salé les Hauts (2), Grand Ilet (8), Langevin (6), Rivière StLouis (5), Les Makes (1), Piton StLeu (4), Ste André (3), SteRose (6), StGilles les Hauts (5), StJoseph (15), StLouis (2), StPaul (10), StPierre (11), Trois Bassins (1), Vincenzo (4), na (2)	43 E, 45 O, 2 na
Petit Molosse (prélèv. poolés)	15	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	Trois Bassins (15)	15 O
Petit Molosse (prélèv. individuels)	10	8	2	0	10	0	0	0	6,8 (±0,48) g	5,5–6,9 g	na	na	StPierre (10)	10 O
Total	631	327	246	43	345	109	41	57						

na : Donnée non disponible (*not available*) ; nd : Non déterminé.

a Jeune : Individu qui ne s'est pas reproduit.

b Subadulte : Jeune adulte dans sa première année de reproduction.

c Parmi les 91 bovins : 52 bovins allaitants et 39 bovins laitiers.

d Parmi les 15 bovins adultes : 4 taureaux et 11 vaches.

e Parmi les 41 subadultes : 11 génisses et 30 taurillons.

f Zone de l'île selon l'isohyète 2000 mm. E = Est, O = Ouest.

Tableau 12 : Types de prélèvements effectués par espèce.

Espèces	Prélèvement pour sérologie MAT			Prélèvements pour PCR		Prélèvements pour culture		Analyse par bandelette urinaire
	Nb total capturés	Sérum	Sang sur buvard ^a	Tissu rénal pour PCR	Urines	Tissu rénal	Urines	Nombre d'analyses
Rat Noir	117	66	80	80	36	37	3	19
Rat Surmulot	7	7	7	7	2	0	0	0
Souris	14	3	14	14	5	0	0	0
Musaraigne	62	3	62	62	22	0	0	0
Tenrec	38	38	0	38	35	0	0	35
Chien	51	50	0	30	27	30	0	27
Chat	30	30	0	30	18	30	0	14
Bovin	91	88	0	89	0	0	0	0
Caprin	60	60	0	60	0	0	0	0
Ovin	5	5	0	5	0	0	0	0
Cerf Rusa	41	34	0	41	0	0	0	0
Porcin	90	89	0	90	0	0	0	0
Petit Molosse (prélèv. poolés)	15	0	na	na	15	0	0	0
Petit Molosse (prélèv. individuels)	10	0	54	0	10	0	0	0
Total	631	473	217	546	170	97	3	95

na : Donnée non disponible (*not available*).

^a Non analysés pour le moment.

1.2. Résultats sérologiques

L'**Annexe I** présente les tableaux des résultats de sérologie et de qPCR par espèce, et pour chaque espèce les résultats sont détaillés en fonction des caractères épidémiologiques relevés.

Nous avons considéré qu'un sérum était positif à un séro groupe si le titre d'agglutination était au moins de 100. Si des agglutinations étaient observées pour plusieurs séro groupes, nous avons considéré que le séro groupe infectant était celui pour lequel le titre présentait au moins deux dilutions d'écart avec les autres. Sinon, nous avons considéré le/les séro groupe(s) infectant(s) comme "non déterminé".

La séroprévalence est la plus élevée chez les rats surmulots (85,7%), puis les rats noirs (78,8%), les cervidés (61,8%), les caprins (60%), les truies (48,3%), les chiens (46%), les bovins (34,5%), les chats (26,7%), et les tangués (15,8%). Le **Tableau 13** présente les résultats de séroprévalence et les intervalles de confiance à 95% de la séroprévalence par espèce. Le **Tableau 14** présente les résultats bruts des sérologies par espèce, qui sont repris dans la **Figure 24**.

Tableau 13 : Séroprévalence et intervalle de confiance de la séroprévalence pour les espèces animales étudiées à La Réunion.

	N	N positifs	Séroprévalence (%)	IC95% de la séroprévalence
Rats noirs	66	52	78,8	68,9 – 88,6
Rats surmulots	7	6	85,7	59,8 – 111,6
Tenrecs	38	5	15,8	4,2 – 27,4
Chats	30	8	26,7	10,8 – 42,4
Chiens	50	23	46,0	32,2 – 59,8
Bovins	87	30	34,1	24,2 – 44,0
Caprins	30	36	60	47,6 – 72,4
Cerfs	34	21	61,8	45,4 – 78,1
Porcins	89	43	48,3	37,9 – 58,7

Le **Tableau 15** présentent les titres en anticorps pour chaque séro groupe et par espèce et la **Figure 25** résume les séro groupes retrouvés comme circulant chaque espèce. Enfin, le **Tableau 16** détaille toutes les réactions d'agglutinations observées dans chaque espèce, ainsi que les titres minimum et maximum.

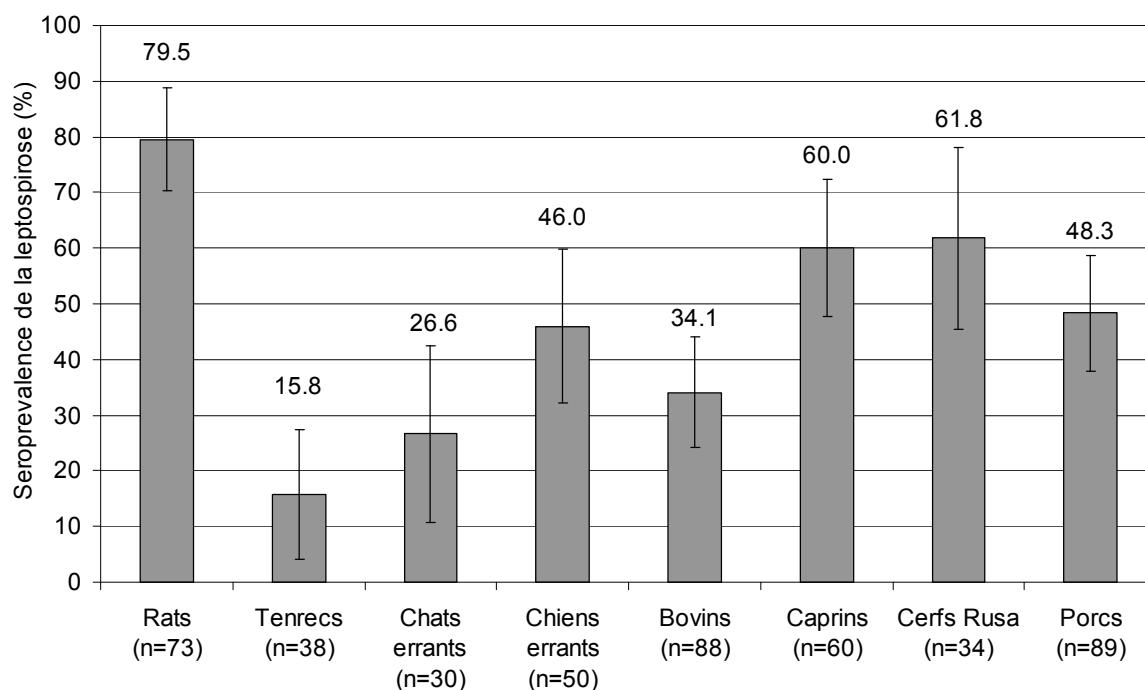


Figure 24 : Séroprévalence par espèce et intervalle de confiance à 95%.

1.2.1. Rats noirs

Le sérotype le plus fréquemment retrouvé chez les rats noirs est *Icterohaemorrhagiae* (22/52, soit 43,3% des séropositifs), avec des titres compris entre 100 et 3200, suivi de *Canicola* (7/52, soit 13,5%) avec des titres compris entre 100 et 400. Nous avons aussi identifié les sérotypes *Sejroe*, *Mini* et *Cynopteri* comme circulant chez le rat noir.

Les réactions à plus d'un sérotype représentent 36,5% des réactions sérologiques positives chez les rats noirs.

1.2.2. Rats surmulots

Chez les rats surmulots, on note la circulation des sérotypes *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Sejroe* et *Panama*. Les titres sont faibles, compris entre 100 et 400.

1.2.3. Tenrec

Chez les tenrecs, le sérotype le plus fréquent est Icterohaemorrhagiae, comptant pour 60% des réactions positives. Des anticorps contre les sérotypes Canicola et Bataviae ont aussi été identifiés. Les titres en anticorps dirigés contre Icterohaemorrhagiae peuvent atteindre 800, tandis que ceux dirigés contre Canicola et Bataviae sont de 100.

1.2.4. Chats errants

Les chats séropositifs le sont généralement à plusieurs sérotypes sans qu'il soit possible de déterminer un sérotype majoritaire (87,5% de sérologies positives à plus d'un sérotype). Le **Tableau 16** présente l'ensemble des sérotypes identifiés chez le chat. Les titres en anticorps anti-leptospires sont relativement faibles chez les chats, puisque compris entre 100 et 400.

1.2.5. Chiens errants

Canicola est le sérotype le plus fréquent chez les chiens (10/23, soit 43,5%), tandis qu'Icterohaemorrhagiae représente 21,7% (5/23) des séropositifs. Les titres en anticorps contre les sérotypes Icterohaemorrhagiae et Canicola peuvent atteindre 1600 et 800 respectivement. Nous avons aussi retrouvés des anticorps contre les sérotypes Sejroe, Panama, Tarassovi et Ballum chez les canidés, avec des titres peu élevés (100 à 400).

1.2.6. Bovins

Chez les bovins, 56,6% des réactions séropositives sont dirigées contre le sérotype Sejroe avec des titres pouvant s'élever jusqu'à 3200. Des réactions sérologiques positives ont aussi été trouvées contre les sérotypes Canicola, Panama, Pyrogenes, Tarassovi et Ballum, avec des titres faibles; ≤ 400). Enfin, 20% des bovins étaient séropositifs à plus d'un sérotype.

1.2.7. Caprins, Cervidés et Porcins

Panama est le séro groupe circulant majoritairement chez les caprins, cervidés et porcins, représentant respectivement 69,4%, 38,1% et 37,2% des séropositifs. Pyrogenes représente le second séro groupe majeurs chez ces trois espèces, avec 16,6%, 23,8% et 25,6% des séropositifs chez les caprins, cervidés et porcins respectivement.

De plus, les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Mini sont retrouvés chez les cervidés et les porcins ; Ballum et Cynopteri sont retrouvés chez les porcins uniquement, tandis qu'un caprin présentait une sérologie positive vis-à-vis du séro groupe Autumnalis.

Chez ces trois espèces, les titres en anticorps sont faibles, généralement inférieurs ou égaux à 400, excepté chez deux caprins qui présentent des titres élevés en anticorps contre le séro groupe Pyrogenes (800 et 1600).

Les réactions à plus d'un séro groupe comptent pour 23,8% des réactions sérologiques positives chez les cervidés, 20,9% chez les porcins et 11,1% chez les caprins.

1.2.8. Souris et Musaraigne

Seulement trois sérologies par MAT sur sérum ont été conduites chez chacune de ces deux espèces. Nous n'avons en effet pas eu le temps au cours de ce travail de thèse de traiter les sérologies sur buvards.

Les trois souris testées étaient séropositives : une contre le séro groupe Icterohaemorrhagie au titre de 3200, tandis que les deux autres étaient séropositives pour plusieurs sérogroupes à des titres plus faibles (100 à 400).

Parmi les trois musaraignes testées, deux étaient séropositives : l'une présentait des anticorps contre Icterohaemorrhagie au titre de 6400, l'autre était séropositive pour le séro groupe Bataviae au titre 400.

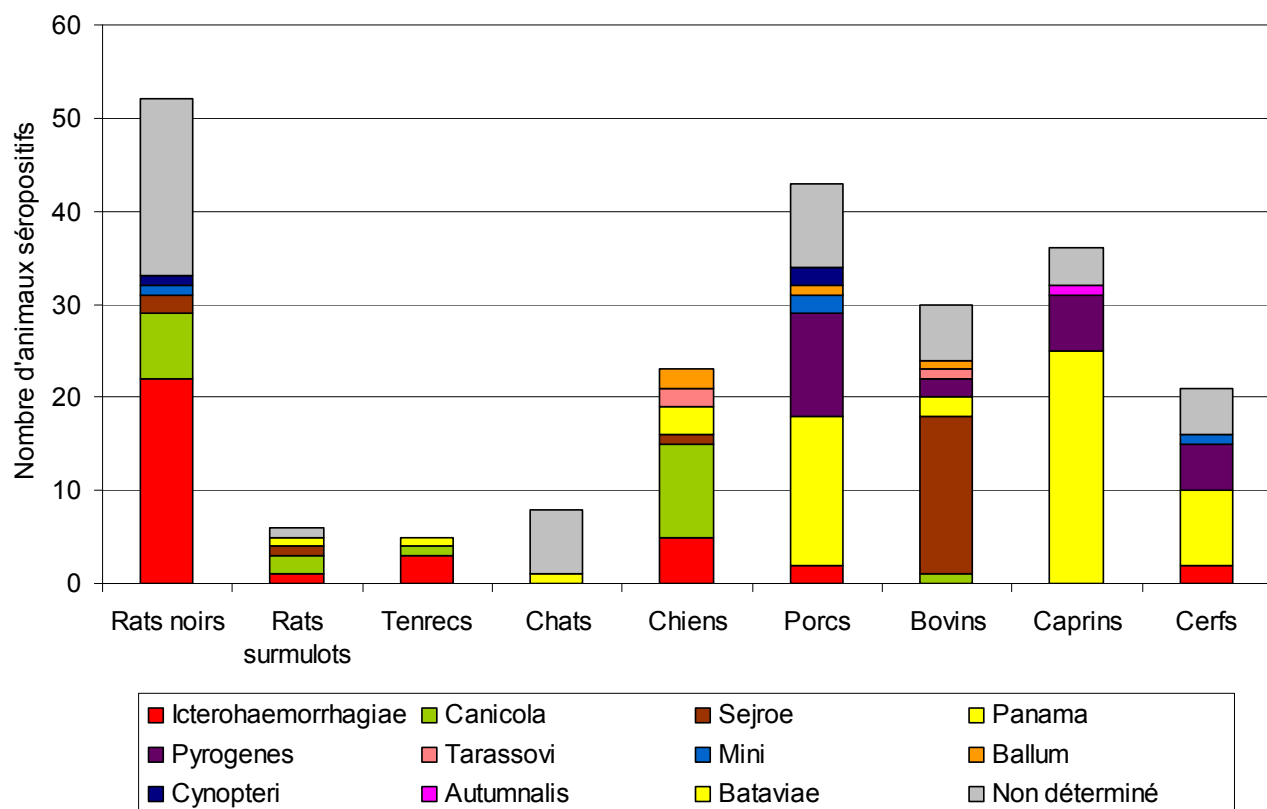


Figure 25 : Nombre d'animaux séropositifs par sérogroupe et par espèce (animaux de La Réunion).

Tableau 14 : Résumé des résultats sérologiques par espèce et par séro groupe.

Les résultats sur musaraignes, souris et ovins ne sont pas présentés car le nombre d'individus testés était ≤ 5 .

	Ictero.	Canicola	Sejroe	Panama	Pyrogenes	Tarassovi	Mini	Ballum	Cynopteri	Autumnalis	Bataviae	Non déterminé	Négatif	Total
Rat noir	22	7	2	0	0	0	1	0	1	0	0	19	14	66
Rat surmulot	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7
Tenrec	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	33	38
Chat	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	22	30
Chien	5	10	1	3	0	2	0	2	0	0	0	0	27	50
Bovin	0	1	17	2	2	1	0	1	0	0	0	6	58	88
Caprin	0	0	0	25	6	0	0	0	0	1	0	4	24	60
Cerf	2	0	0	8	5	0	1	0	0	0	0	5	13	34
Porcin	2	0	0	16	11	0	2	1	2	0	0	9	46	89
Total	35	21	21	56	24	3	4	4	3	1	1	51	238	462

Ictero. = Icterohaemorrhagiae.

Tableau 15 : Titres minimum et maximum obtenus par MAT pour chaque séro groupe, par espèce.

Les réactions de co-agglutinations ne sont pas présentées.

	Ictero.	Canicola	Sejroe	Panama	Pyrogenes	Tarassovi	Mini	Ballum	Cynopteri	Autumnalis	Bataviae
Rat noir	100-3200	100-400	100, 400	/	/	/	100	/	3200	/	/
Rat surmulot	400	200, 400	200	100	/	/	/	/	/	/	/
Tenrec	200-800	100	/	/	/	/	/	/	/	/	100
Chat	/	/	/	100	/	/	/	/	/	/	/
Chien	100-1600	100-800	400	100	/	200, 400	/	100	/	/	/
Bovin	/	200	100-3200	100	100	400	/	100	/	/	/
Caprin	/	/	/	100-400	100-1600	/	/	/	/	200	/
Cerf	400	/	/	100-200	100	/	800	/	/	/	/
Porcin	200, 400	/	/	100-400	100-400	/	100, 400	100	100, 100	/	/

Tableau 16 : Résultats détaillés de séroprévalence, minimum et maximum des titres en anticorps.

Les réactions de co-agglutinations ne sont pas prises en compte et toutes les réactions positives sont présentées.

Espèces	Séroprévalence (%)	Sérogroupe	Nombre de réactions d'agglutination significative	Titre minimum	Titre maximum
Rat Noir	52/66 (78,8)	Australis	1	400	400
		Autumnalis	2	100	100
		Bataviae	5	100	200
		Ballum	3	200	1600
		Canicola	18	100	1600
		Cynopteri	4	100	3200
		Grippytyphosa	5	100	1600
		Hebdomadis	5	100	1600
		Icterohaemorrhagiae	37	100	3200
		Mini	9	100	800
		Panama	9	100	1600
		Pomona	4	100	800
		Pyrogenes	7	100	1600
		Sejroe	11	100	3200
		Tarassovi	5	400	3200
Rat Surmulot	6/7 (85,7)	Canicola	3	200	400
		Icterohaemorrhagiae	1	400	400
		Panama	1	100	100
		Sejroe	2	200	400
Souris	3/3 (100)	Canicola	2	100	200
		Icterohaemorrhagiae	3	100	3200
		Pyrogenes	2	200	400
Musaraigne	2/3 (66,6)	Bataviae	1	100	100
		Icterohaemorrhagiae	1	6400	6400
Tenrec	6/38 (15,8)	Bataviae	1	100	100
		Canicola	1	100	100
		Icterohaemorrhagiae	3	200	800
Chien	23/50 (46,0)	Bataviae	1	200	200
		Ballum	3	100	100
		Canicola	10	100	800
		Icterohaemorrhagiae	5	100	1600
		Panama	3	100	100
		Sejroe	1	400	400
		Tarassovi	2	200	400
Chat	8/30 (26,7)	Australis	1	200	200
		Ballum	1	100	100
		Canicola	3	100	100
		Icterohaemorrhagiae	1	200	200
		Mini	1	200	200
		Panama	6	100	400
		Pomona	1	200	200
		Pyrogenes	4	100	400
Bovin	30/88 (34,1)	Ballum	1	100	100
		Canicola	3	200	800
		Icterohaemorrhagiae	1	400	400
		Mini	4	100	400
		Panama	2	100	100
		Pyrogenes	5	100	200
		Sejroe	21	100	3200
Caprin	36/60 (60,0)	Tarassovi	2	100	400
		Autumnalis	1	200	200
		Ballum	1	200	200
		Panama	30	100	400
Ovin	0/5 (0,0)	Pyrogenes	9	100	1600
Cerf Rusa	21/34 (61,8)	/	/	/	/
		Icterohaemorrhagiae	4	100	400
		Mini	1	800	800
		Panama	15	100	200
Porcin	42/89 (47,2)	Pyrogenes	9	100	100
		Australis	1	200	200
		Autumnalis	2	100	100
		Ballum	3	100	200
		Canicola	1	100	100
		Cynopteri	3	100	100
		Icterohaemorrhagiae	2	200	400
		Mini	2	100	400
		Panama	24	100	400
		Pyrogenes	14	100	200
		Sejroe	1	100	100
		Tarassovi	1	100	100

1.3. Prévalence du portage rénal (résultats des qPCR)

Les résultats de prévalence du portage rénal par espèce sont reportés dans le **Tableau 17** et résumés graphiquement sur la **Figure 26** ; les résultats de prévalence de l'excrétion urinaire sont reportés dans la **Figure 27** (comme le nombre d'animaux étudiés pour la prévalence de l'excrétion urinaire était faible, nous ne présentons pas les IC95%).

Bien que Tulsiani *et al.* [326] montrent une parfaite concordance entre les résultats de PCR sur reins et sur urines, notre étude démontre que la proportion d'animaux détecté comme présentant une leptospirurie est inférieure à la proportion d'animaux porteurs de leptospires au niveau rénal.

La détection de la présence de leptospires au niveau rénal est un témoin plus sensible que la détection de la bactérie dans les urines, cette dernière étant intermittente [9].

Dans notre étude, nous considérons tout animal porteur rénal de *Leptospira* comme excréteur (transitoire ou chronique) de la bactérie, et donc contributeur à la contamination de l'environnement, pendant une période de durée variable en fonction de l'espèce et de l'individu.

Tableau 17 : Prévalence du portage rénal chez les animaux étudiés à La Réunion et intervalle de confiance à 95% (IC95%).

	N	N positifs	Prévalence du portage rénal (%)	IC95% de la prévalence du portage rénal
Rats noirs	76	50	65,8	55,1 – 76,4
Rats surmulots	6	4	66,6	28,9 – 104,3
Souris	13	11	84,6	65,0 – 104,2
Musaraignes	48	15	31,25	18,1 – 44,4
Tenrecs	34	0	0	/
Chats	21	6	28,6	9,2 – 47,9
Chiens	24	7	29,2	11,0 – 47,3
Bovins	76	14	18,4	9,7 – 27,1
Caprins	49	13	26,5	14,2 – 38,9
Cerfs	32	6	18,8	5,2 – 32,3
Ovins	5	0	0	/
Porcins	83	13	15,6	7,8 – 23,5

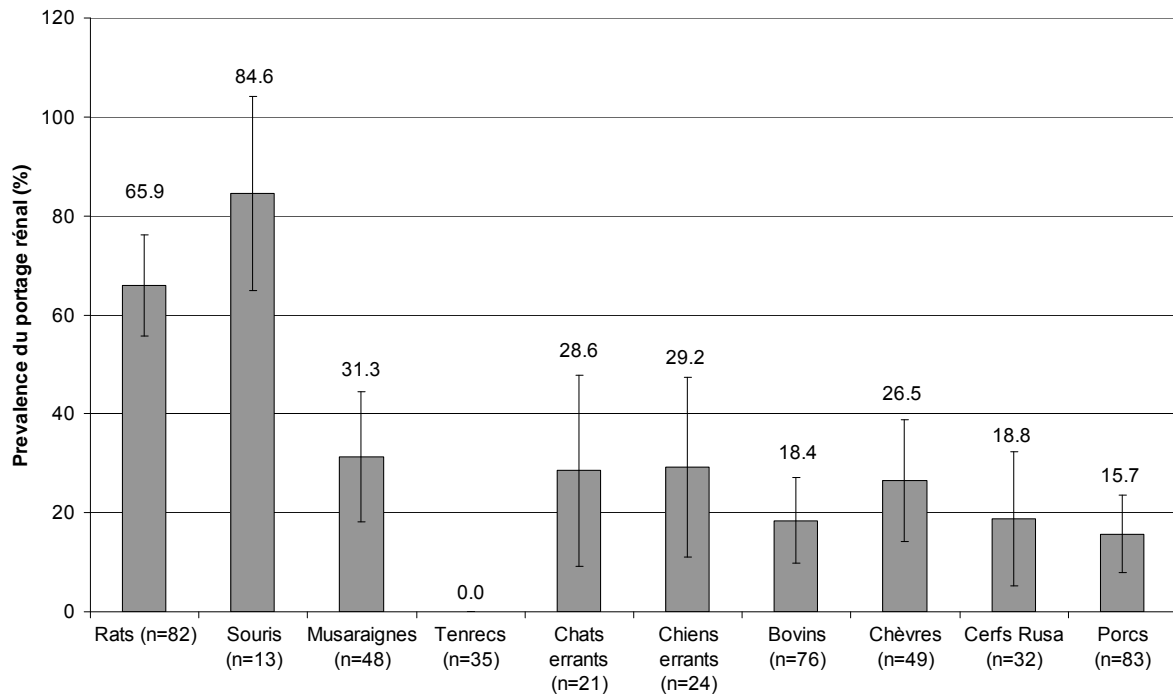


Figure 26 : Prévalence du portage rénal de *Leptospira*, par espèce, et intervalle de confiance à 95%.

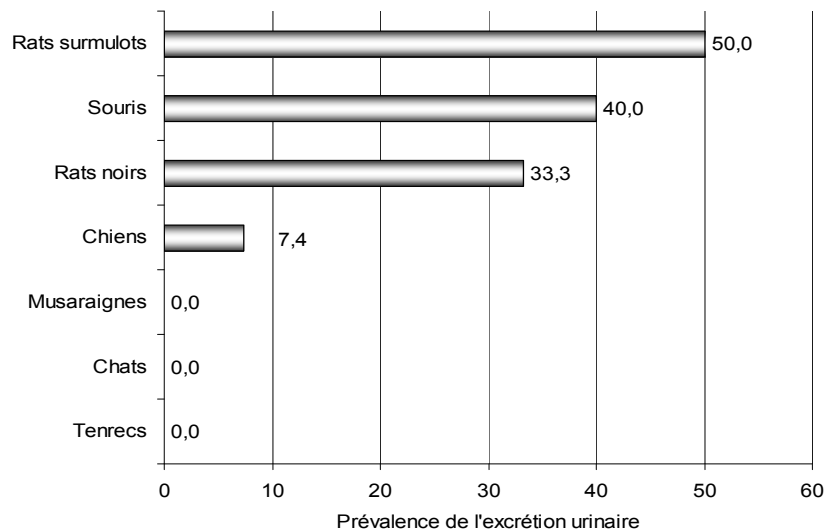


Figure 27 : Prévalence de l'excrétion urinaire par espèce évaluée par qPCR ciblant le gène *lipL32*.

Les résultats des qPCR sur les prélèvements poolés d'urine de chauves-souris ont montré 80% (12/15) d'échantillons présentant des inhibiteurs, tandis que 20% (3/15) des échantillons étaient négatifs. Les prélèvements individuels d'urine présentaient des inhibiteurs pour 80% (8/10) d'entre eux, mais deux individus (20%) prélevés ont été détectés comme excréteurs urinaires par qPCR, bien que les Ct soient élevés (39,64 et 32,26 cycles).

1.4. Résultats des cultures de reins et d'urines

Les cultures de reins et urines n'ont pas donné de résultats probants. En effet, aucune culture faite à partir de reins de chien ou de chat n'a été positive (alors que certains de ces échantillons ont donné des résultats positifs en qPCR). Par ailleurs, si les observations microscopiques ont permis d'observer des leptospires dans deux cultures rénales de rats noirs prélevés en 2010, des contaminants se sont par la suite développés dans ces cultures et nous n'avons pas pu les conserver.

La détection des leptospires par culture constitue la méthode de référence pour le diagnostic de leptospirose [9]. L'isolement de souches locales est très important pour l'étude épidémiologique de la maladie à l'échelle locale et peut par la suite servir au diagnostic sérologique puisque les souches isolées localement montrent une sensibilité plus élevée que les souches de référence pour l'agglutination [13].

Néanmoins, la méthode de culture est difficile à mettre en œuvre, notamment parce que le prélèvement doit être stérile, et l'ensemencement fait dans les quelques heures suivant la mort de l'animal [13], ce qui est assez difficile à mettre en œuvre avec des prélèvements effectués sur le terrain sur des animaux sauvages (alors que cela est plus simple à mettre en œuvre avec des animaux de laboratoire).

Les limites inhérentes à cette méthode de diagnostic sont notamment le temps de croissance de *Leptospira* (le temps de doublement de *Leptospira* issu d'un prélèvement biologique frais est de 14-18 heures [9]). La méthode nécessite donc une mise en incubation d'au moins 13 semaines à 29-30°C avant de pouvoir certifier qu'une culture est négative, et une observation hebdomadaire des cultures au microscope à fond noir [9].

Nous avons choisi de ne pas ajouter d'antibiotique ni d'inhibiteur spécifique dans nos milieux de culture, ce qui s'est avéré être un choix discutable puisque des contaminants se sont développés dans la plupart de nos cultures. De plus, pour un meilleur taux de réussite de la culture, il est recommandé pour chaque échantillon de faire plusieurs cultures [13], ainsi que des dilutions de la culture initiale au 1/10, 1/100 et 1/1000. Un tel protocole était trop lourd à mettre en place techniquement et financièrement.

1.5. Charge bactérienne rénale moyenne

1.5.1. Description des données

Tableau 18 : Moyenne et écart-type de la charge bactérienne rénale par espèce ($\ln(x+1)$).

Espèce	Moyenne	Ecart-type
Souris	9,558604	6,118195
Rat noir	8,006725	4,818165
Musaraigne	6,912003	1,215829
Cerf	6,899426	2,053467
Chèvre	6,043060	1,688780
Bovin	5,415365	2,105522
Cochon	5,321066	2,044777
Rat surmulot	5,151589	2,512027
Chat	4,951693	2,102823
Chien	4,949695	3,007801

Les plus grandes moyennes de charge rénale sont observées pour la souris et le rat noir mais les écart-types les plus importants pour les valeurs de charge bactérienne rénale sont aussi observés dans ces deux espèces. Au contraire, les valeurs de charge bactérienne rénale sont relativement homogènes pour les autres espèces (**Figure 28**).

Le test de Fisher-Snedecor de l'analyse de variance montre qu'il n'y a pas d'effet "espèce" sur la charge rénale moyenne ($p\text{-value} > 0.05$).

1.5.2. Conclusion

L'objectif était de vérifier que les valeurs des moyennes de charge bactérienne rénale observées chez le rat noir ($5,7 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^7$ copies de génome/mg de rein) et chez la souris ($6,4 \times 10^6 \pm 8,5 \times 10^3$) étaient réellement (c'est-à-dire statistiquement) différentes des moyennes observées chez les autres espèces. L'analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différence significative.

Pour certaines espèces, les effectifs des animaux positifs sont faibles (rats surmulots $n=4$, chats $n=6$, chiens $n=7$, cerfs $n=7$) et ne permettent pas aux tests statistiques d'être assez puissants pour détecter de possibles différences.

Les rats noirs et les souris présentent une dispersion très importante de la charge allant avec des quantifications allant de faibles à élevées. Cette plus grande hétérogénéité des

mesures de charges pour ces deux espèces pourrait laisser supposer des variations dans la technique :

- Les échantillons de tissu rénal utilisés pour l'extraction n'étaient pas prélevés exactement au même endroit du rein induisant une variation de la quantité de leptospires (présents dans les tubules contournés proximaux du cortex et absents de la zone médullaire) dans l'échantillon de départ ;
- Il existe des variations de rendement de la qPCR.

Nous éliminons immédiatement la seconde hypothèse puisque nous avons utilisé un témoin positif quantifié dans chaque run et avons vérifié que la variation du nombre de cycles pour l'amplification de ce témoin était inférieur ou égal à trois cycles.

De plus, tous les échantillons positifs ont été amplifiés quatre fois, dans des runs différents, toute différence du nombre de cycles pour un même échantillon a été vérifiée. Par ailleurs, toutes les extractions et qPCR ont été faites sur une même période pour toutes les espèces, ce qui nous permet d'éliminer un problème technique lié au matériel ou à la technique d'extraction et/ou d'amplification. Enfin, s'il s'agissait d'un problème lié au manipulateur, cette hétérogénéité des valeurs de charge bactérienne rénale serait retrouvée au sein de toutes les espèces. Or, ce n'est pas le cas.

Par conséquent, nous pensons que nous sommes face à un phénomène biologique et/ou physiologique. L'hétérogénéité observée dans la quantification de la colonisation rénale chez le rat noir et la souris pourrait être liée à des facteurs soit propres à ces deux espèces et uniquement à celles-ci, soit à des facteurs individuels, par exemple d'âge, de poids ou de sexe.

Pour chaque espèce, les proportions d'adultes et de jeunes positifs pour la recherche de leptospires au niveau rénal sont les suivantes (**Annexe I**) :

- Tous les caprins et porcins prélevés sont des adultes. Par conséquent, on ne peut pas tester l'effet de l'âge sur la charge bactérienne rénale dans ces espèces ;
- Nous n'avons pas l'âge des cerfs, mais l'âge d'abattage est le même pour tous les animaux ;
- Chez les bovins, les animaux positifs sont des surtout des subadultes (9), 3 sont des adultes et 2 des veaux ;
- Chez les chiens tous les animaux positifs sont des adultes ;
- Chez les chats, 3 positifs sont des adultes et 3 sont des jeunes ;

- Chez les musaraignes, 14 adultes sont porteurs au niveau rénal, tandis qu'un seul jeune a été trouvé positif ;
- Sur les 50 rats noirs porteurs de leptospires au niveau rénal, 34 sont des adultes et 16 sont des jeunes ;
- Chez les souris, sur les 11 animaux positifs, 8 sont adultes et 3 sont des jeunes.

Nous suspectons que les variations d'âge chez les animaux positifs induisent l'hétérogénéité observée dans les charges bactériennes rénales chez le rat noir et la souris et qu'elles peuvent expliquer l'hétérogénéité des résultats. Nous avons donc étudié les variations de la charge bactérienne rénale en fonction de l'âge et du poids (lui-même lié à l'âge chez les rongeurs) pour les rats noirs (les souris ne présentant qu'un nombre trop restreint d'individus).

Nous avons construit les graphiques de dispersion de la charge bactérienne rénale (transformée en $\ln[x+1]$) en fonction du poids pour les adultes et les jeunes rats noirs (**Figure 29**).

Nous avons cherché à mettre en évidence l'existence d'une relation linéaire entre la charge bactérienne rénale et le poids, chez les adultes d'une part et chez les jeunes d'autre part :

Chez les rats noirs adultes, l'équation de la droite de régression est la suivante :

$$y = 0,029x + 4,324$$

L'intervalle de confiance à 95% sur la pente de régression est de $[-0.037 - 0.096]$, indiquant une pente non significativement différente de 0.

Chez les jeunes rats noirs, l'équation de la droite de régression est la suivante :

$$y = 0,086x - 1,147$$

L'intervalle de confiance à 95% sur la pente de régression est de $[0.018 - 0.154]$, indiquant une pente significativement positive au seuil de 5%.

Nous mettons donc en évidence l'existence d'une corrélation positive entre le poids et la charge bactérienne rénale chez les jeunes rats noirs.

Chez les rats noirs, la grande variance observée dans les données de charge bactérienne rénale est probablement liée aux différences pondérales entre les individus.

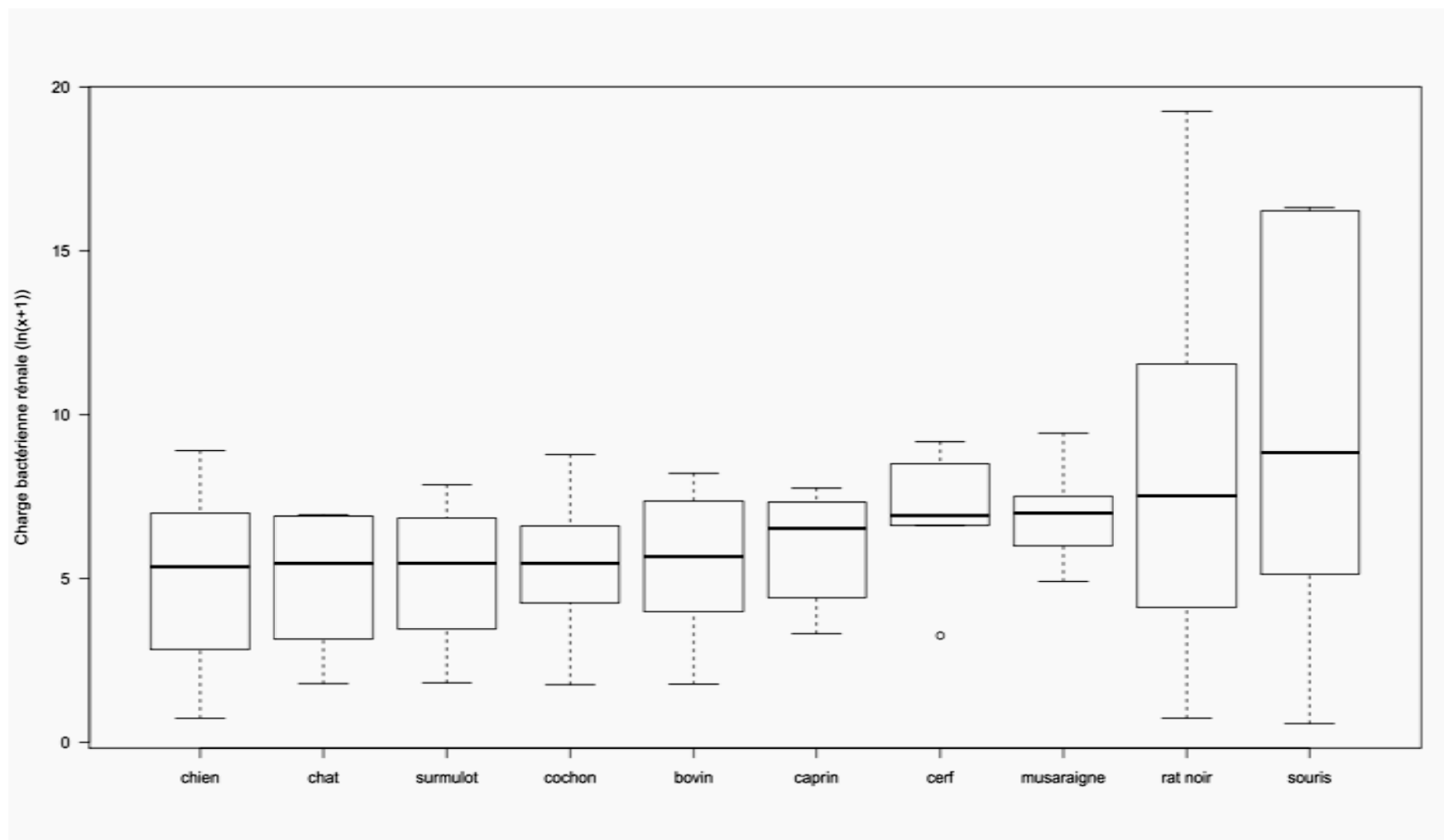


Figure 28 : Cartographie des résultats de charge bactérienne rénale par espèce.

Graphique représentant la médiane (trait gras horizontal) de $\ln(\text{charge bactérienne rénale}+1)$, le premier quartile (limite inférieure du rectangle), le troisième quartile (limite supérieure du rectangle) et l'écart-type (moustache).

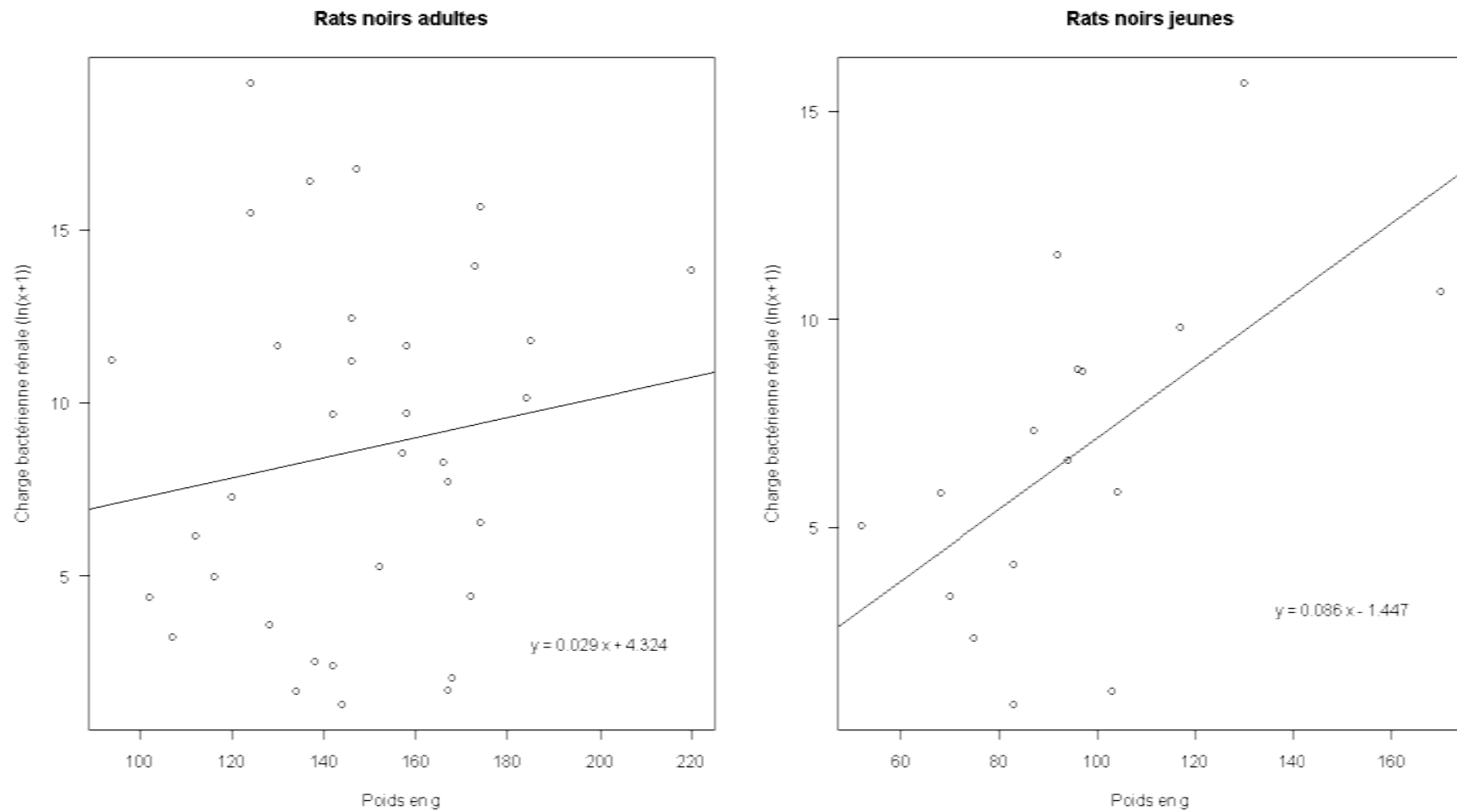


Figure 29 : Poids des rats noirs adultes et jeunes en fonction de la charge bactérienne rénale ($\ln[x+1]$), droite de régression et équation de la droite.

1.6. Facteurs de risque de séropositivité

1.6.1. Tableaux de contingence

Dans les tableaux de contingence, nous n'avons considéré que les qPCR pour lesquelles nous avons un résultat "positif" ou "négatif" (les qPCRs pour lesquelles nous avons détecté la présence d'"inhibiteurs" n'ont pas été prises en compte).

Tableau 19 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR sur rein chez les carnivores domestiques.

	Variables	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la qPCR sur rein	
	Niveaux	Chien	Chat	Femelle	Mâle	Adulte	Juvénile	Est	Ouest	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	27	22	23	26	31	18	10	29	18	7
	Séropositif	23	8	13	18	25	6	11	14	14	5

Tableau 20 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR sur rein chez les rongeurs.

	Variables	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la qPCR sur rein		
	Niveaux	Rat surmulot	Rat noir	Souris	Femelle	Mâle	Adulte	Juvénile	Est	Ouest	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	1	14	0	5	10	12	3	6	9	8	6
	Séropositif	6	52	3	27	33	44	17	38	23	16	43

Tableau 21 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR sur rein chez les tenrecs.

	Variables	Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la qPCR sur rein	
	Niveaux	Femelle	Mâle	Adulte	Juvénile	Est	Ouest	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	23	10	19	14	17	16	0	0
	Séropositif	2	3	1	4	4	1	0	0

Tableau 22 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, le sexe, l'âge, le type d'élevage, le résultat de la qPCR sur rein et la race chez les bovins.

	Variables	Sexe		Age		Type d'élevage			Résultat de la qPCR sur rein	
	Niveaux	Femelle	Mâle	Adulte	Subadulte	Juvénile	Allaitant	Laitier	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	10	48	6	20	32	27	31	43	4
	Séropositif	13	17	9	19	2	23	7	18	9
	Variables	Race								
	Niveaux	Blonde d'Aquitaine	Brune	Charolaise	Limousine	Croisée	Montbéliarde	Prim'Holstein		
Résultat de la sérologie	Séronégatif	1	0	1	9	15	1	30		
	Séropositif	0	1	0	10	13	0	6		

Tableau 23 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, le sexe, et le résultat de la qPCR sur rein chez les caprins.

	Variables	Sexe		Résultat de la qPCR sur rein	
	Niveaux	Femelles	Mâles	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	21	3	15	21
	Séropositif	30	6	6	7

Tous les caprins prélevés sont des animaux adultes. Il nous manque la localisation de l'élevage pour la majorité des caprins.

Tableau 24 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique, la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la qPCR sur rein chez les cerfs.

	Variables	Localisation de l'élevage		Résultat de la qPCR sur rein	
	Niveaux	Ferme du Tampon	Ferme de Saint-Leu	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	9	4	8	2
	Séropositif	5	16	13	4

Pas d'information sur le sexe et l'âge des cerfs prélevés.

Tableau 25 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique et le portage rénal chez les porcins.

	Variables	Résultat de la qPCR sur rein	
	Niveaux	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	40	4
	Séropositif	30	8

89/90 porcins prélevés sont des truies de réforme adultes.

1.6.2. Résultats des analyses statistiques

Aucun facteur de risque parmi ceux testés ne s'est révélé significativement lié à la séropositivité chez les rongeurs, les carnivores errants, les tenrecs, les caprins et les porcins (**Tableau 26**).

1.6.2.1. Bovins

Chez les bovins, plusieurs facteurs de risque ont pu être mis en évidence (**Tableau 26**) :

- Être une femelle est un facteur de risque de séropositivité ($p = 0,009$; $OR = 3,67$; $IC\ 95\%^{18} [1,37 - 10,16]$).

¹⁸ IC = Intervalle de confiance à 95%.

- L'âge (obtenu grâce aux dates de naissance et d'abattage inscrites sur le passeport bovin) est un facteur de risque de séropositivité ($p = 1,6 \times 10^{-4}$; OR = 1,040 ; [1,02 - 1,07]) :
- Les bovins adultes (vaches, taureaux) ont plus de chance d'être séropositifs que les veaux ($p = 4,1 \times 10^{-4}$; OR = 24,0 ; [4,82 - 187,07]).
- Les bovins subadultes (génisses et taurillons) ont plus de chance d'être séropositifs que les veaux ($p = 6,3 \times 10^{-4}$; OR = 15,20 ; [3,86 - 102,03]).
- Les bovins allaitants ont plus de chance d'être séropositifs que les bovins laitiers ($p = 0,006$; OR = 3,77 ; [1,45 - 10,78]).
- Plus le poids du bovin est élevé, plus il a de chance d'être séropositif ($p = 1,3 \times 10^{-6}$; OR = 1,11 ; [1,06 - 1,17]).

L'effet "race" n'a pas été testé chez les bovins car cette variable est liée au type de production.

Chez les bovins, l'association des variables "sexe" et "âge" est celle qui explique le mieux la séropositivité ($p < 0.01$ et $p < 0.001$; OR corrigés 4,47 et 1,01 et IC 95% corrigés [1,46 - 15,25] et [1,00 - 1,02] respectivement). Dans ce modèle, l'interaction entre les variables "sexe" et "âge" n'est pas significative ($p = 0,7$).

Les tests statistiques montrent a/ que les bovins adultes et subadultes ont plus de chance que les jeunes d'être séropositifs, b/ que les bovins femelles ont plus de chance d'être séropositives que les mâles.

Or, chez les bovins, la répartition des âges chez les mâles et les femelles est différente : chez les adultes, il y a plus de femelles que de mâles, et chez les veaux, il y a plus de mâles que de femelles. Nous supposons par conséquent que l'effet du sexe sur la séropositivité des bovins est lié à l'effet de l'âge.

La moyenne pondérale observée pour les bovins femelles est de $269,3 \pm 99,5$ kg, tandis que celle observée chez les bovins mâles est de $236,7 \pm 79,3$ kg (non significativement différent : $t = -1,16$ et IC95% [-88,5-23,26] ; $df = 89$; $p\text{-value} = 0,25$). La moyenne pondérale observée pour les bovins laitiers est de $158,0 \pm 79,3$ kg (cette moyenne est "tirée vers le bas" car la plupart des bovins laitiers étudiés sont des veaux "de lait"), tandis que celle observée chez les bovins allaitants est de $310,8 \pm 99,5$ kg. Ces deux moyennes sont statistiquement différentes ($t = 7,8$ et IC95% [114,2-94,3] ; $p = 7,3 \times 10^{-12}$). Il existe donc une liaison entre la

variable poids et la variable type de production (allaitant *versus* laitier). Cette donnée devra être prise en compte dans la discussion des résultats d'analyse statistique.

L'analyse statistique montre que la contamination par *Leptospira* se fait généralement à partir de l'âge de 4 mois (âge des veaux "de lait" prélevés dans notre étude), mais qu'elle peut aussi avoir lieu après, entre l'âge de 2 ans (âge des taurillons et génisses) et l'âge adulte. L'infection peut aussi avoir lieu à l'âge adulte. Plus l'animal vieillit plus la probabilité qu'il ait été en contact avec la bactérie est élevée. Les animaux se recontaminent probablement au cours de leur vie, par l'environnement ou par contact direct avec l'urine des animaux infectés du troupeau (contamination intra-élevage) ou d'animaux introduits provenant d'un autre troupeau (contamination inter-élevage).

1.6.2.2. Cerfs Rusa

Chez les cerfs, le facteur localisation de l'élevage a une influence sur la séropositivité des animaux, et les analyses statistiques montrent que si l'animal provient de l'élevage du Tampon, il a plus de chance d'être séropositif qu'un animal originaire de l'élevage de Saint-Leu ($p = 0,008$; $OR = 7.20$; $[1,64 - 37,87]$).

Les conditions d'élevage au Tampon sont peut-être plus favorables à la transmission de la bactérie. En effet, le climat du Tampon est plus humide que le climat de Saint-Leu (côte ouest de l'île), donc supposé plus propice au maintien des leptospires dans l'environnement.

Etant donné que les cerfs proviennent de deux élevages, il est probable que la variable "localisation de l'élevage" se confonde avec la variable "zootechnie" que nous n'avons pas évaluée directement. Nous ne disposons pas d'informations sur les élevages qui nous permettraient de poser des hypothèses quant aux pratiques à risque.

Tableau 26: Facteurs de risque de séropositivité parmi les différentes espèces étudiées.

Espèce (nb testé)	Facteurs de risque épidémiologiques testés	Nb séro-positifs	p	OR brut (IC 95%)	OR corrigé (IC 95%)
Carnivores errants ^a (n = 80)	Espèce (chien/chat)	23 / 8	0,081		
	Sexe (femelle/mâle)	13 / 18	0,331		
	Age (adulte/juvenile)	25 / 6	0,092		
	Lieu de capture (est/ouest)	11 / 14	0,129		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	14 / 5	0,901		
Rongeurs ^b (n = 76)	Espèce (rat surmulot/ rat noir/souris)	6 / 52 / 3	0,460		
	Sexe (femelle/mâle)	27 / 33	0,409		
	Age (adulte/juvenile)	44 / 17	0,526		
	Lieu de capture (est/ouest)	38 / 23	0,119		
	Poids ^c		0,743		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	16 / 43	0,036*	3,58 [1,08 – 12,49]	
Tenrecs (n = 38)	Sexe (femelle/mâle)	2 / 3	0,204		
	Age (adulte/juvenile)	1 / 4	0,108		
	Lieu de capture (est/ouest)	4 / 1	0,215		
	Poids ^c		0,144		
Bovins (n = 88)	Sexe (femelle/mâle)	13 / 17	0,009*	3,670 [1,37 - 10,16]	4,471 [1,457 - 15,250]
	Age (adulte/juvenile)	9 / 2	4,1e-04*	24,00 [4,82 - 187,08]	ns
	Age (subadulte/juvenile)	19 / 2	6,3e-04*	15,20 [3,86 - 102,03]	ns
	Age exact ^c		1,6e-04*	1,040 [1,02 – 1,07]	ns
	Poids ^c		1,3e-06*	1,111 [1,06 - 1,14]	1,012 [1,006 - 1,019]
	Type (allaitant/laitier)	23 / 7	0,006*	3,772 [1,45 - 10,78]	ns
	Nombre de ferme(s) fréquentées ^c		0,745		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	18 / 9	0,008*	5,37 [1,54 – 21,99]	
Caprins (n = 60)	Sexe	30 / 6	0,655		
	Poids ^c		0,604		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)		0,779		
Porcins ^d (n = 89)	Poids ^c		0,172		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	14 / 5	0,081		
Cerf Rusa ^e (n = 34)	Lieu d'élevage (Tampon/St-Leu)	5 / 16	0,008*	7,20 [1,638 - 37,872]	
	Poids ^c		0,341		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	13 / 4	0,830		

^a Chiens et chats.

^b Rats noirs, rats surmulot, et souris.

^c Variable continue (pas de table de contingence).

^d 89/90 porcins échantillonnés étaient des truies de réformes.

^e Pas d'information sur le sexe et l'âge disponibles.

1.7. Facteurs de risque de portage rénal

1.7.1. Tableaux de contingence

Tableau 27 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie pour les carnivores domestiques.

	Variables	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la sérologie	
	Niveaux	Chien	Chat	Femelle	Mâle	Adulte	Juvenile	Est	Ouest	Séronégatif	Séropositif
	Résultat de la qPCR sur rein										
	Négatif	17	15	17	15	20	12	8	17	18	14
	Positif	7	6	8	5	10	3	3	6	7	5

Tableau 28 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie pour les rongeurs.

	Variables	Espèce			Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la sérologie	
	Niveaux	Rat surmulot	Rat noir	Souris	Femelle	Mâle	Adulte	Juvénile	Est	Ouest	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	2	26	2	10	20	18	12	17	13	8	16
	Positif	4	50	11	29	35	45	20	33	32	6	43

Tableau 29 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, le sexe, l'âge et le lieu de capture pour les musaraignes.

	Variables	Sexe		Age		Lieu de capture	
	Niveaux	Femelles	Mâles	Adultes	Juveniles	Est	Ouest
	Résultat de la qPCR sur rein						
	Négatif	17	16	26	7	11	22
	Positif	9	6	14	1	8	7

Tableau 30 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, le sexe, l'âge, le type d'élevage, la localisation du dernier élevage, le résultat de la sérologie et la race pour les bovins.

	Variables	Sexe		Age		Type d'élevage			Résultat de la sérologie	
	Niveaux	Femelle	Mâle	Adulte	Subadulte	Juvenile	Allaitant	Laitier	Séro-négatif	Séro-positif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	17	46	10	28	25	33	30	43	18
	Positif	3	11	3	9	2	12	2	4	9
	Variables									
		Race								
	Niveaux	Blonde d'Aquitaine		Brune	Charolaise	Limousine	Croisée	Montbéliarde	Prim'Holstein	
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	1		1	1	10	20	1	28	
	Positif	0		0	0	6	6	0	2	

Tableau 31 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, le sexe et le résultat de la sérologie pour les caprins.

	Variables	Sexe		Résultat de la sérologie	
	Niveaux	Femelle	Mâle	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	28	8	15	6
	Positif	12	1	21	7

Tous les caprins prélevés sont des animaux adultes. Il nous manque la localisation de l'élevage pour la majorité des caprins.

Tableau 32 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal, la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la qPCR sur rein pour les cerfs.

	Variables	Localisation de l'élevage		Résultat de la sérologie	
	Niveaux	Ferme du Tampon	Ferme de Saint-Leu	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	13	13	8	13
	Positif	2	4	2	4

Pas d'information sur le sexe et l'âge des cerfs prélevés.

1.7.2. Résultats des analyses statistiques

Aucun facteur de risque parmi ceux testés ne s'est révélé statistiquement significatif pour expliquer le portage rénal chez les rongeurs, les carnivores errants, les musaraignes, les caprins, et les porcins (**Tableau 33**).

Chez les bovins, les résultats de l'analyse montrent que (**Tableau 33**) :

- Plus un bovin est lourd, plus il a de chance d'être porteur rénal ($p = 0,002$; $OR = 1,09$; $IC\ 95\% [1,03 - 1,18]$. La variable poids est directement corrélée à l'âge ou à la catégorie d'âge, néanmoins, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre les facteurs de risque "âge exact" et "catégorie d'âge" et le portage rénal de *Leptospira*.
- Un bovin allaitant a plus de chance d'être porteur rénal qu'un bovin laitier ($p = 0,015$; $OR = 5,45$; $[1,34 - 36,92]$).

Par ailleurs, nous avons vu auparavant que les bovins allaitants avaient en moyenne un poids supérieur aux bovins laitiers et que ces deux variables étaient liées. Il convient donc d'interpréter avec prudence les effets "type de production" et "poids" car on ne peut pas différencier lequel a un effet véritable sur le portage rénal ou si les deux sont effectivement des facteurs de risque.

Chez les cerfs, plus un animal est léger, plus il a de chance d'être porteur rénal ($p = 0,015$; OR = 0,69 ; [0,47 – 0,94], **Tableau 33**).

1.7.3. Lien entre séropositivité et portage rénal

Chez les rongeurs et les bovins, nous mettons en évidence une relation significative entre l'infection rénale et la séropositivité (**Tableau 26**) :

- Un rongeur a 3,58 (OR) fois plus de chance d'être séropositif s'il est porteur rénal et *vice versa* ($p = 0,036$; IC 95% [1,08 - 12,49]).
- Un bovin a 5,37 fois plus de chance d'être séropositif s'il est porteur rénal et *vice versa* ($p = 0,008$; IC 95% [1,54 - 21,99]).

Cette relation entre séropositivité et portage rénal de *Leptospira* n'a pas été mise en évidence chez les autres espèces animales étudiées.

Tableau 33 : Facteurs de risque d'infection rénale par *Leptospira* (qPCR sur rein positif) parmi les différentes espèces étudiées.

Espèce (nb testé)	Facteurs de risque épidémiologiques testés	Nb qPCR sur rein positifs	p	OR brut (IC 95%)	OR corrigé (IC 95%)
Carnivores errants ^a (n = 45)	Espèce (chien/chat)	7 / 6	0,965		
	Sexe (femelle/mâle)	8 / 5	0,605		
	Age (adulte/juvenile)	10 / 3	0,342		
	Lieu de capture (est/ouest)	3 / 6	0,941		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	7 / 5	0,901		
Rongeurs ^b (n = 95)	Espèce (rat surmulot/ rat noir/souris)	4 / 50 / 11	0,359		
	Sexe (femelle/mâle)	29 / 35	0,268		
	Age (adulte/juvenile)	45 / 20	0,379		
	Lieu de capture (est/ouest)	33 / 32	0,592		
	Poids ^c		0,695		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	6 / 43	0,036*	3,58 [1,08-12,49]	
Musaraignes (n = 48)	Sexe (femelle/mâle)	9 / 6	0,583		
	Age (adulte/juvenile)	14 / 1	0,179		
	Lieu de capture (est/ouest)	8 / 7	0,191		
	Poids ^c	0,191	0,425		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)				
Bovins (n = 77)	Sexe (femelle/mâle)	3 / 11	0,663		ns
	Age (adulte/juvenile)	10 / 25	0,180		ns
	Age (subadulte/juvenile)	9 / 2	0,093		ns
	Age exact ^c		0,162		ns
	Poids ^c	12 / 2	0,002*	1,09 [1,03 - 1,18]	1,009 [1,00 - 1,01]
	Type (allaitant/laitier)	12 / 2	0,015*	5,45 [1,34 - 36,92]	ns
	Nombre de ferme(s) fréquentées ^c		0,745		ns
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	4 / 9	0,008*	5,37 [1,542 - 21,990]	ns
Chèvres ^d (n = 49)	Sexe	12 / 1	0,213		
	Poids ^c		0,673		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)		0,779		
Porcins ^e (n = 83)	Poids ^c		0,960		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	4 / 8	0,125		
	Lieu d'élevage (Tampon/St-Leu)	5 / 16	0,456		
Cerf Rusa ^f (n = 32)	Poids ^c		0,015*	0,69 [0,47 - 0,94]	
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	2 / 4	0,830		

^a Chiens et chats.

^b Rats noirs, rats surmulot, et souris.

^c Variable continue (pas de table de contingence).

^d Pas d'informations sur la localisation de l'élevage d'origine.

^e 89/90 porcins échantillonnés étaient des truies de réformes.

^f Pas d'information sur le sexe et l'âge disponibles.

1.8. Analyses par bandelettes urinaires

1.8.1. Intérêt d'étudier les paramètres urinaires : éléments de bibliographie

Densité urinaire

La densité urinaire chez des chiens et chats sains peut varier de 1,001 à 1,065. Plus communément, on accepte qu'un chien et un chat ayant une fonction rénale normale aient une densité urinaire $> 1,030$ et $> 1,035$ respectivement. Il est important d'interpréter la densité urinaire en fonction de l'état d'hydratation de l'animal [474].

Hématurie

Une hématurie concomitante avec un taux de globules rouges sanguin normal peut être indicateur d'une pathologie des voies basses de l'appareil urinaire ou du tractus génital (urètre, prostate, vagin, pénis, vessie) parmi lesquelles les pathologies infectieuses, néoplasiques, idiopathiques ou inflammatoires, ou alors de l'appareil urinaire supérieur (rein, uretères), comme une pyélonéphrite ou une néoplasie [474].

Glycosurie

La plupart des bandelettes ont une limite de sensibilité de 40-80 mg/dl pour le glucose urinaire, mais elles sont semi-quantitatives au-delà de ce niveau, avec un changement de coloration plus intense si la concentration de glucose urinaire augmente. Une glycosurie peut être causée par une hyperglycémie ou une atteinte du tubule rénal proximal. Le tubule proximal réabsorbe normalement la quasi-totalité du glucose filtré. Lorsque la concentration sanguine et donc la concentration de l'ultrafiltrat excède les capacités du tubule proximal (environ 180 mg/dl chez le chien, 300 mg/dl chez le chat), du glucose apparaît dans les urines [474].

Cétonurie

Les principaux corps cétoniques rencontrés chez les chiens et chats sont les acides acéto-acétique et hydroxybutyrique. Un grand nombre de substances peuvent provoquer des réactions faussement positives à l'analyse urinaire, comme la bilirubine par exemple. Les corps cétoniques sont produits par le métabolisme des acides gras. Un diabète mal contrôlé est

la cause la plus fréquente d'apparition de corps cétoniques, mais on peut aussi l'observer chez un animal affamé, ou ayant un régime riche en protéines et pauvres en glucides. Par ailleurs, certains médicaments peuvent aussi induire une cétonurie [474].

Nitrites

Certaines bactéries ont la capacité de transformer les nitrates en nitrites. Néanmoins, la présence ou l'absence de nitrites n'est pas un marqueur fiable d'une bactériurie chez les chiens et chats [474].

Leucocyturie

La bandelette urinaire permet la détection des estérases qui se trouvent dans les granules des granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Chez les chiens, le test est spécifique, mais non sensible (il ne permet pas de détecter tous les cas de pyurie, mais lorsqu'il est positif, il permet d'affirmer la pyurie). La présence de globules blancs peut être indicatrice d'infection ou d'inflammation. A cause du fort taux de faux-positifs chez les chats, ce paramètre n'est pas utilisable dans cette espèce [474].

Protéinurie

La bandelette urinaire donne une estimation semi-quantitative de la protéinurie. L'indicateur de couleur est plus sensible à l'albumine qu'aux autres protéines, et dans la plupart des urines, l'albumine est la principale protéine (sa proportion chez le chien sain varie de 40% à 100% selon les auteurs [475]). Les résultats sont exprimés en "traces" (10 mg/dl), 1+ (30 mg/dl), 2+ (100 mg/dl), 3+ (300 mg/dl), ou 4+ (1000 mg/dl). Des urines très alcalines ou très concentrées peuvent induire des résultats faussement positifs. Une protéinurie peut être d'origine pré-glomérulaire, glomérulaire, ou post-glomérulaire. Les causes pré-glomérulaires incluent la fièvre, un effort physique important, une congestion veineuse, ou une hyperprotéinémie (comme par exemple lors d'un myélome multiple). Une protéinurie glomérulaire est causée par une atteinte de la barrière de filtration glomérulaire et est la plus commune et la plus grave cause de protéinurie. Une protéinurie post-glomérulaire peut être causée par une inflammation vésicale ou du tractus génital, ou par une atteinte tubulaire (inflammation des tubules ou défaut de réabsorption du taux normal de protéines filtrées) [474].

1.8.2. Tableaux de contingence

Nous avons des résultats de qPCR sur rein et d'analyses urinaires pour quatre espèces : le rat noir, le chien, le chat et le tangué.

La densité de l'urine et son pH n'ont pas été pris en compte car il existe pour ces deux paramètres une variabilité inter-espèce et les valeurs de référence ne sont pas connues pour toutes les espèces étudiées.

Aucun animal ne présentait de glycosurie.

Tableau 34 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et l'espèce pour les quatre espèces étudiées.

Résultat de la qPCR sur rein	Espèce				p-value
	Rat noir	Chat	Chien	Tangué	
Négatif	6	11	13	31	3.5x10 ⁻⁰⁷ *
Positif	11	1	7	0	

Tableau 35 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une hématurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Hématurie						p-value
	Absence	Traces	+	++	+++	++++	
Négatif	32	12	0	2	14	1	0,41
Positif	6	5	0	2	6	0	

Tableau 36 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une cétonurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Cétonurie						p-value
	Absence	Traces	+	++	+++	++++	
Négatif	52	4	0	1	0	4	0,03*
Positif	11	1	2	1	1	3	

Tableau 37 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence de nitrites dans les urines, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Nitrites			p-value
	Absence	Traces	+	
Négatif	60	0	1	0,46
Positif	19	0	0	

Tableau 38 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une leucocyturie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Leucocyturie				p-value
	Absence	Traces	+	++	
Négatif	51	0	7	3	0,11
Positif	14	2	2	1	

Tableau 39 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal et la présence d'une protéinurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Protéinurie						p-value
	Absence	Traces	+	++	+++	++++	
Négatif	8	12	26	7	6	2	0,01*
Positif	4	0	6	4	1	4	

1.8.3. Résultats des analyses statistiques

L'analyse statistique de la variable "espèce" montre que le rat noir a plus de chance d'être porteur rénal que les trois autres espèces considérées ($p = 3.5 \times 10^{-7}$).

Deux paramètres urinaires sont statistiquement liés à la présence de leptospires au niveau rénal pour les quatre espèces considérées simultanément: la protéinurie ($p = 0,01$) et la cétonurie ($p = 0,03$).

1.8.4. Discussion

L'analyse statistique démontre qu'il existe un lien significatif entre la présence de protéines dans les urines et l'infection rénale par *Leptospira* chez les chiens, chats et rats noirs échantillonnés pour cette étude¹⁹ (aucun tenrec n'était porteur de leptospires au niveau rénal).

La protéinurie est un signe décrit chez les patients humains atteints de leptospirose, elle est généralement associée à une hématurie [476]. La protéinurie est aussi décrite chez le chien atteint de leptospirose [477].

La quantité de protéines plasmatiques dans les urines dépend de la filtration glomérulaire mais aussi du taux de réabsorption tubulaire des protéines de faible poids

¹⁹ Nous considérons toutes les espèces simultanément car le nombre d'animaux par espèce était insuffisant pour une analyse statistique par espèce.

moléculaire. Dans un rein fonctionnant normalement, les protéines de faible poids moléculaire sont filtrées puis entrent dans le tubule proximal où elles sont réabsorbées en quasi-totalité et catabolisées par les cellules tubulaires. En fonction de la localisation des lésions rénales (glomérulaires ou tubulaires), on observe un profil particulier de protéines urinaires, caractérisées par leur poids moléculaire. Ainsi, une augmentation de l'excrétion des protéines de poids moléculaire moyen à haut est associée à des lésions glomérulaires, tandis qu'une augmentation des protéines de faible poids moléculaire est associée à des lésions tubulaires [477].

Lors d'infection leptospirosique, plusieurs facteurs peuvent être associés à l'atteinte rénale aiguë : l'action néphrotoxique directe des leptospires, une hyperbilirubinémie, un phénomène de rhabdomyolyse, et une hypovolémie [478].

Afin de déterminer les protéines urinaires excrétées lors de leptospirose chez le chien, Zaragora *et al.* [477] ont conduit une étude sur les urines de dix chiens infectés et vingt chiens sains. L'analyse montre trois types de protéines urinaires supplémentaires chez les chiens malades. Chez seulement deux des chiens malades des IgG et des IgA sont détectables dans les urines, alors qu'un troisième animal ne présente que des IgG. L'étude montre une augmentation de 36,7% de l'excrétion des protéines de faible poids moléculaire chez les chiens atteints de leptospirose. Ces résultats montrent que la leptospirose canine est principalement caractérisée par une néphrite interstitielle [477]. Cependant, Ortega-Pacheco *et al.* [338] ont démontré que chez le chien, l'atteinte rénale la plus fréquente est la glomérulonéphrite mésangio-proliférative, la seconde lésion la plus fréquemment observée est la néphrite interstitielle associée à la glomérulonéphrite mésangio-proliférative. Chez le chat, la néphrite interstitielle et la glomérulonéphrite sont aussi décrites chez des chats errants chez lesquels *Leptospira* avait été isolée à partir de tissu rénal [479].

La pathogenèse de l'infection naturelle par *Leptospira* chez les rats n'a été que très peu étudiée. Une étude sur des rats sauvages ayant des titres élevés de séropositivité a montré que des lésions inflammatoires du tissu rénal pouvaient être reliées à une infection récente par *Leptospira* [480]. Récemment, de Faria *et al.* [481] ont montré que dans une population de rats sauvages ayant une prévalence élevée de portage rénal, l'observation d'une néphrite interstitielle ne pouvait être attribuée à la maladie car l'inflammation est observée à la même fréquence chez les animaux infectés ou non infectés. Ainsi, l'étude de l'infection naturelle est complexe car de nombreux facteurs environnementaux (y compris d'autres infections)

peuvent induire des pathologies rénales chez les rats sauvages qui ne peuvent être différenciées de la pathologie induite par *Leptospira* [481].

Par conséquent, la protéinurie observée chez les rats, chiens et chats porteurs de leptospires au niveau rénal est probablement directement liée à la présence de la bactérie au niveau des tubules contournés proximaux et à l'excrétion des IgG dirigées contre la bactérie. Néanmoins, chez ces animaux sauvages, nous ne pouvons négliger la probable présence d'infections concomitantes qui pourraient être responsables d'une augmentation de l'excrétion urinaire de protéines.

Enfin, l'analyse statistique montre que la présence de corps cétoniques est plus fréquente chez les animaux présentant un portage rénal par *Leptospira* que chez les animaux sains. Or, la présence de corps cétoniques dans les urines peut être le résultat d'un régime alimentaire déséquilibré ou d'une famine chez les carnivores [474] et le rat [482], biaisant alors le lien statistique établi avec la maladie. De plus, la présence de bilirubine, marqueur de souffrance hépatique, peut causer des résultats faussement positifs.

2. Publication des résultats

Article 4 : Desvars A, Naze F, Benneveau A, Cardinale E, Michault A. 2012. Domestic and wild animal species as reservoir hosts of leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean). *Zoonoses and Public Health*.

3. Discussion sur l'épidémiologie et l'écologie de la leptospirose animale à La Réunion

3.1. Espèces hôtes de *Leptospira*

Les remarques suivantes, communes à toutes les espèces, ne seront pas reprises par la suite :

1/ Pour un même sérum, l'observation d'agglutinations significatives pour plusieurs sérogroupes (sérologie "non déterminé") est un résultat difficilement interprétable puisque nous ne pouvons pas déterminer si ces différents anticorps sont le résultat des réponses immunitaires à des infections passées ou récentes ou alors le résultat de réactions croisées. Les réactions croisées sont fréquentes en début d'infection, mais pas dans les mois suivants l'infection [292]. Ainsi, pour déterminer le véritable statut sérologique des animaux, il aurait été nécessaire d'utiliser de sérums pairés, prélevés à 5-10 jours d'intervalle [13], ce qui se révèle impossible pour les micromammifères, et difficile à mettre en œuvre pour les animaux de rébte et les animaux errants.

2/ La présence de *Leptospira* dans les reins des animaux est la preuve que l'animal est infecté au moment du prélèvement (avec ou sans symptôme) mais ne démontre pas que cet animal est excréteur (intermittent ou continu) de la bactérie. La notion de "réservoir" [483], qui induit une notion de chronicité de l'infection, pourra être avancée en considérant, à l'échelle d'une population animale, les résultats de séroprévalence, de prévalence du portage rénal et d'excrétion urinaire.

3/ L'absence de détection de *Leptospira* dans l'urine des animaux identifiés comme porteurs au niveau rénal trouve deux explications :

- La discontinuité de l'excrétion urinaire [9, 13],
- Une concentration faible de bactéries dans les urines, c'est-à-dire en dessous du seuil de détection de la qPCR.

Ces deux hypothèses expliquant l'absence de leptospires dans les urines alors que l'animal est porteur rénal sont valables pour toutes les espèces et nous ne les reprendrons donc pas par la suite.

4/ Les anticorps circulant ne correspondant pas toujours à la souche présente dans les reins [292], c'est pourquoi les résultats du MAT sont à considérer avec précautions : le résultat sérologique d'un animal porteur rénal ne permet pas d'affirmer avec certitude l'identité du sérotype excrété. Néanmoins, les résultats de sérologie ont un fort pouvoir prédictif à l'échelle de la population pour déterminer les sérotype y circulant majoritairement.

3.1.1. Rats (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) et souris domestiques (*Mus musculus*)

Rappel des résultats (Annexe I, Tableaux 1 à 3)

Rats noirs

Séroprévalence : 52/66 (78,8%)

Prévalence du portage rénal : 50/76 (62,5%)

Charge bactérienne rénale : $5,7 \times 10^6$ ($\pm 3,3 \times 10^7$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 12/36 (33,3%)

Rats surmulots

Séroprévalence : 6/7 (85,7%)

Prévalence du portage rénal : 4/6 (66,6%)

Charge bactérienne rénale : $7,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 1/2 (50%)

Souris domestiques

Séroprévalence : 3/3 (100%)

Prévalence du portage rénal : 11/13 (84,6%)

Charge bactérienne rénale : $6,4 \times 10^6$ ($\pm 8,5 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 2/5 (40%)

Le rat noir, *R. rattus*, et le rat surmulot, *R. norvegicus*, sont des généralistes, omnivores manifestant de grandes capacités d'adaptation [472]. Par ailleurs, à La Réunion (comme à Mayotte) ces rats n'ont que peu de prédateurs [472]. La souris domestique est une espèce commensale de l'homme. Elle vit dans les maisons, les champs cultivés et s'éloigne généralement peu des zones anthropisées [484]. Les populations de rongeurs fluctuent de façon saisonnière au cours de l'année [485], sous la pression de facteurs extrinsèques, tels que la disponibilité en nourriture, l'effet de pathogènes, ou la présence de prédateurs (busard de Maillard, chat, chien et Homme à La Réunion) [485, 486]. Ces rongeurs allochtones sont réputés anthropophiles mais tout à fait susceptibles de coloniser les milieux naturels [487]. A La Réunion, l'espèce de rongeur dominante est *R. rattus*. Ces trois espèces de rongeurs se reproduisent toute l'année en milieu insulaire tropical [486, 488] mais en Martinique et Guadeloupe il y a une très nette baisse des naissances chez *Rattus* sp. pendant 3 mois et deux pics de mises bas (Michel Pascal, communication personnelle). En milieu naturel, la durée de vie estimée de *Rattus* sp. est d'1-2 ans [488], celle de *Mus* sp. ne dépasse pas 18 mois [484].

La population de rats à La Réunion est très dense. La seule estimation de densité connue est celle effectuée en 2010-2011 par la Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR) sur le massif de la Roche Ecrue : l'étude conduite sur un protocole de captures-recaptures estime la densité de rats à 21 à 54 individus/ha sur l'ensemble du massif forestier de la Roche Ecrue [489]. À supposer que cette densité soit la même sur l'ensemble de l'île de La Réunion l'effectif de la population insulaire de rat noir s'élèverait à 5 271 000 – 13 554 000 individus !!

Une étude de terrain a montré qu'aux Antilles françaises les trois espèces de rongeurs, *R. rattus*, *R. norvegicus* et *M. musculus*, se répartissent en fonction des écosystèmes disponibles sur l'île. L'étude montre que les parcelles cultivées jouent le rôle de réservoirs pour la souris domestique alors que les "savanes" (formations à épiphytes) et la forêt tropicale humide jouent ce rôle à l'égard du rat noir. De plus, l'écotone que constituent les bordures des parcelles cultivées favorisent les déplacements des deux espèces de *Rattus* et permettent l'installation du rat surmulot [487]. Cette répartition des espèces en fonction de l'habitat pourrait entraîner une variation du risque de contamination par *Leptospira* en fonction de l'écosystème considéré.

Les rongeurs (rats noirs, rats surmulots et souris) sont les espèces hôtes chez lesquelles nous avons retrouvé la plus forte séroprévalence et le taux de portage rénal le plus élevé. Les rongeurs sont résistants à l'infection par *Leptospira* et sont des porteurs chroniques de la bactérie [490, 491]. La densité de leur population, leur répartition sur l'ensemble de l'île et les taux de séroprévalence et de portage rénal observés font de ces micromammifères les hôtes principaux de *Leptospira* à La Réunion.

Lors d'infection, la colonisation rénale a lieu après la phase immune [13]. Nous montrons que chez les rongeurs, la séropositivité est significativement corrélée au portage rénal (OR = 3,58), ce qui suggère que les recontaminations (par une même souche ou par différentes souches de *Leptospira*, voir **section 1, Chapitre IV**) sont fréquentes et stimulent de façon continue le système immunitaire et la synthèse d'anticorps. Ces ré-infections se font à partir de l'environnement ou directement par le biais des contacts sociaux [492].

Les titrés élevés de séropositivité (jusqu'à 3200) et la corrélation positive séropositivité/portage rénal laissent penser que les réinfections sont fréquentes chez les rats (le faible nombre de résultats sérologiques disponibles pour les souris ne nous permettant pas de conclure pour cette espèce).

Nous montrons qu'à La Réunion 73,6% des sérums de *R. rattus* ont des anticorps contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae (déterminé par MAT), 32,1% des sérums de *R. rattus* et 50% des sérums de *R. norvegicus* en montrent une pour Canicola, et enfin, 18,9% des sérums de *R. rattus* montrent une agglutination pour Sejroe. Tous les autres sérogroupes testés par MAT ont été retrouvés chez *R. rattus* mais sont probablement le résultat de réactions de co-agglutinations. Seules trois souris ont fait l'objet d'examens sérologiques toutes trois présentaient des anticorps contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae, dont une souris à un titre de 3200. Ces résultats sont très similaires à ceux publiés dans d'autres régions du monde qui montrent que les rats sont généralement porteurs des sérovars Copenhageni et Icterohaemorrhagiae, mais peuvent occasionnellement être porteurs d'autres sérovars [280, 327, 445, 493, 494, 495, 496].

Le séro groupe Icterohaemorrhagiae est le séro groupe majoritaire circulant chez les rongeurs à La Réunion. C'est aussi le séro groupe responsable de la majorité des infections cliniques en population humaine réunionnaise.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que Canicola circule chez les deux espèces de rats à La Réunion. Sur l'île voisine de Madagascar, *R. rattus* et *R. norvegicus* sont réservoirs du séro groupe Canicola [496] et il est donc possible que ce aussi soit le cas à La Réunion.

Sejroe est le principal séro groupe retrouvé chez les bovins à La Réunion (**Article 4**). Parmi nos sites de capture un seul présentait un petit élevage de bovins allaitants composé d'une dizaine d'animaux (site de Takamaka, situé dans les hauts de Saint-Benoît, dans l'est de l'île). Nous remarquons que mis à part un rat noir capturés à Saint-Paul, tous les rats noirs séropositifs pour le séro groupe Sejroe provenaient du site de Takamaka. De plus, parmi les trois rats surmulots capturés sur ce secteur (tous séropositifs), deux présentaient des anticorps contre le séro groupe Sejroe. Nous n'avons pas de résultat sérologique pour les souris et musaraignes capturées sur ce site, ni pour les bovins présents au moment des captures de micromammifères. Le rat est considéré comme une source de contamination pour les bovins dans de nombreuses régions du monde [383, 497]. Nous pouvons par conséquent suspecté que

sur le site de Takamaka, la présence d'anticorps dirigés contre Sejroe chez ces rats est liée à l'existence d'un cycle de transmission rats-bovins.

A La Réunion, le rat noir et le rat surmulot sont probablement des sources d'infection pour les bovins et des vecteurs transportant les bactéries entre les élevages.

Nous montrons que 36,5% des rats noirs séropositifs le sont pour plus d'un sérotype. Ce pourcentage s'élève à 22,4% dans l'étude de Villanueva *et al.* [292], conduite sur des rats capturés sur le terrain aux Philippines. Pour certains de ces animaux, ces agglutinations multiples reflètent des infections multiples par différents sérotypes au, mais pour d'autres, il s'agit de réactions non spécifiques [292]. Il ne nous est pas possible de discerner les deux

Le taux de portage rénal est de 62,5% et 66,6% chez le rat noir et le rat surmulot respectivement, ce qui est supérieur à la prévalence rapportée à Iquitos (Pérou) où 21.7% des *R. norvegicus* ($n=83$) et 4.6% des *R. rattus* ($n=151$) sont porteurs de leptospires [498], à celle rapportée aux Philippines où 43% des rats ($n=106$) ont été démontré porteurs de leptospires [292], ou à Madagascar où Rahelinirina *et al.* [496] rapportent 48.9% ($n=94$) et 30.8% ($n=55$) de porteurs chez *R. norvegicus* et *R. rattus* respectivement. Notre prévalence est néanmoins proche de celle estimée dans la population de rats de Détroit (59.2% de porteurs) [327]. Dans la ville de Salvador (Brésil), la prévalence du portage rénal chez *R. norvegicus* est très supérieure, estimée à 80.3% ($n=142$) [328].

De plus, nous avons mis en évidence l'excrétion urinaire de *Leptospira* chez 12/36 (33.3%) *R. rattus* et 1/2 *R. norvegicus*. Parmi ces animaux, dix seulement étaient porteurs et excréteurs, tandis que pour trois rats excréteurs urinaires nous n'avions pas de prélèvement de tissu rénal analysable (présence d'inhibiteurs de PCR). Des analyses complémentaires de génotypage sont en cours afin de déterminer si, pour chaque animal, la souche présente au niveau rénal est la même que celle détectée dans les urines.

Chez la souris le taux de portage rénal est de 84,6% et nous avons mis en évidence l'excrétion urinaire de leptospires chez 2/5 souris. La prévalence du portage rénal chez *M. musculus* à La Réunion est très supérieur à celle estimée dans d'autres études chez la même espèce : 9.1% à Madagascar ($n=55$) [496] ou 44% ($n=43$) en Argentine [499]. Cependant, la prévalence de l'infection rénale à La Réunion est similaire à celle rapportée

dans une étude conduite sur l'île de Terceira (Açores) où 85.4% des souris domestiques portaient des leptospires au niveau rénal [290].

Presque deux tiers des rats de notre enquête et presque 85% des souris étaient porteurs de leptospires au niveau rénal. Les rongeurs sont résistants à l'infection par *Leptospira* [287, 500], et ces animaux, réservoirs de leptospirose, contaminent l'environnement *via* leurs urines infectées, de façon intermittente ou chronique.

Nous observons que la charge bactérienne est très variable en fonction des individus (cf. écart-types très élevés). La concentration de leptospires dans les reins a été estimée en moyenne à $5,7 \times 10^6$ ($\pm 3,3 \times 10^7$) copies de génome/mg de rein chez *R. rattus*, $7,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein chez *R. norvegicus* et $6,4 \times 10^6 \pm 8,5 \times 10^3$ copies de génome/mg de rein. Nous n'avons pas pu établir de comparaison statistique de ces moyennes, entre elles ou avec celles estimées chez les autres espèces, car les variances de ces trois séries de données ont été non homogènes (voir **section 1.4, Chapitre VI**). Aucune étude antérieure n'a comparé les charges bactériennes rénales entre plusieurs espèces animales, par conséquent, nous ne disposons à ce jour d'aucune donnée bibliographique suggérant l'existence d'une différence dans les capacités de fixation rénale de *Leptospira* entre les rongeurs, ni entre les rongeurs et d'autres mammifères. Cependant, nos résultats soulèvent la question de la capacité des reins à tolérer la colonisation par *Leptospira* :

- le rat noir et la souris ont-ils une tolérance rénale supérieure à la colonisation par la bactérie ?
- s'il existe une différence dans les capacités rénales des réservoirs rongeurs, cela induit-il une différence dans la contribution de ces espèces à la contamination de l'environnement ?

Une fois contaminés, les rongeurs peuvent excréter la bactérie et contaminer l'environnement pendant plusieurs mois [325]. Thiermann [325] montre que l'infection chronique se développe plus rapidement et les bactéries sont excrétées plus longtemps chez les *R. norvegicus* infectés par le sérotype Icterohaemorrhagiae (220 jours) que chez ceux infectés par Grippotyphosa (40 jours). La concentration de leptospires dans les urines 28 jours post-infection chez le rat de laboratoire de type "Dawley" (*R. norvegicus*) a été évaluée autour de 10^7 bactéries/ml [287], démontrant la grande capacité de contamination du milieu par cette espèce.

Compte-tenu de la densité de sa population, de sa distribution dans tous les milieux de l'île, de la forte prévalence du portage rénal rapporté pour cette espèce, et qu'il semble être un réservoir important du séroroupe *Icterohaemorrhagiae* le rat noir semble être, à La Réunion, l'espèce de micromammifère qui contribue le plus à la contamination de l'environnement, donc de l'Homme.

Bien que discrète, la souris est présente dans la majorité des habitats de l'île [75]. L'importance potentielle de la souris dans l'épidémiologie de la leptospirose a été mise en évidence dans de nombreuses autres régions du monde, comme à Madagascar [496], au Brésil [495, 501], en Argentine [499], sur l'île de Terceira (Açores, Portugal) [290], à la Barbade [297], au Colorado [502], en Croatie [295], en Guadeloupe [282, 487]...

Espèce trop souvent négligée dans les campagnes de lutte contre la maladie, la souris domestique doit être considérée comme un hôte réservoir de *Leptospira* à La Réunion.

Nous n'observons pas dans notre étude de différence significative de séroprévalence ou de prévalence de portage rénal en fonction de l'âge, du sexe ou de la zone de vie (est ou ouest) chez les rongeurs. Au contraire, chez certaines espèces vivant en zone tempérée, comme les opossums en Nouvelle-Zélande (*Trichosurus vulpecula*), la transmission est dépendante des contacts sociaux entre les individus et intervient par conséquent préférentiellement à l'âge adulte [492].

Aux Açores, le sexe des rongeurs n'a pas d'influence sur leur statut vis-à-vis de la leptospirose [503] et chez *R. rattus* et *R. norvegicus*, l'âge n'a pas d'influence sur la séroprévalence ou le statut de porteur rénal. Néanmoins, chez les souris l'âge a un effet significatif sur la prévalence du portage rénal qui est supérieure chez les souris adultes [503]. Dans leurs études, Mohamed-Hassan *et al.* [504] et Vanasco *et al.* [499] concluent que la prévalence de la leptospirose est plus importante chez les rats mâles que chez les femelles respectivement dans les régions de Kelantan et Terengganu (Malaisie) et en Argentine.

Plusieurs conclusions sont à tirer sur la situation réunionnaise :

- La contamination chez les rongeurs se fait tôt [327] et la probabilité de contact avec la bactérie est identique chez les adultes et chez les jeunes ;
- La contamination est la même chez les mâles et chez les femelles ;

- Le lieu de vie, donc la pluviométrie, n'intervient pas sur la probabilité de contamination chez ces rongeurs.

Chez les rats mâles ou femelles, lors des combats pour le territoire, la dominance ou la reproduction [505], les animaux se font des plaies et urinent, par conséquent, les comportements d'agression sont des facteurs favorisant la transmission directe de la leptospirose dans la population de rongeurs.

Par conséquent, chez les rongeurs, le mode de transmission direct semble majoritaire par rapport à la contamination indirecte.

L'environnement contaminé, par les rongeurs notamment, est aussi une source de contamination (indirecte) pour ces espèces, mais surtout il représente une source d'infection pour les autres espèces animales (dont). La saison des pluies favorise la survie de la bactérie dans le milieu, c'est pourquoi l'incidence de la maladie augmente chez l'Homme en cette saison [156]. La contamination *via* l'environnement est majoritaire chez l'Homme, en particulier en zone tropicale (à La Réunion l'incidence de la maladie chez l'Homme, liée à la pluviométrie [156], est supérieure à l'est qu'à l'ouest [88, 201]).

La lutte contre les rongeurs semble la solution de choix pour lutter contre la leptospirose... Néanmoins, c'est sans compter la grande adaptabilité de ces espèces à différents environnements ainsi que la grande capacité de reproduction qui rend la lutte en milieu anthropisé et tropical, riche en ressources alimentaires, très difficile.

3.1.2. Insectivores : musaraigne musquée (*Suncus murinus*) et tanguie (*Tenrec ecaudatus*)

Rappel des résultats (Annexe I, Tableaux 4 et 5)

Musaraignes

Séroprévalence : 2/3 (66,6%)

Prévalence du portage rénal : 15/48 (31,25%)

Charge bactérienne rénale : $2,1 \times 10^3$ ($\pm 3,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 0/22

Tenrecs

Séroprévalence : 5/38 (13,2%)

Prévalence du portage rénal : 0/34

Prévalence de l'excrétion urinaire : 0/33

Avec un taux de portage rénal estimé à 31,2% et une charge bactérienne moyenne de $2,1 \times 10^3$ ($\pm 3,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein au niveau des reins, la musaraigne musquée semble représenter une espèce hôte de choix pour *Leptospira* à La Réunion.

Le rôle épidémiologique de cet insectivore a déjà été mis en évidence dans d'autres régions, notamment à Madagascar, où le taux de portage rénal a été évalué à 43,5% [496], et en Thaïlande [506].

Cette espèce est retrouvée en milieux forestiers, aussi bien qu'agricoles et anthropisés. Elle peut rentrer dans les habitations [507]. Sa reproduction a lieu toute l'année, La gestation est d'environ 30 jours et l'effectif de la portée varie de 4 à 8 petits, qui sont sevrés à l'âge de 15 à 20 jours. La maturité sexuelle est atteinte vers 35 jours chez la femelle. Les populations de *S. murinus* peuvent atteindre des effectifs élevés, l'espèce est très adaptable à différents écosystèmes.

A La Réunion, la musaraigne, appelée localement "rat musqué", est présente dans la majorité des habitats réunionnais (*observations personnelles*). La densité de sa population, méconnue, est probablement importante. Cette espèce, commensale de l'homme, peu considérée dans l'épidémiologie de la leptospirose, devra être prise en compte dans l'organisation de la lutte contre cette zoonose sur l'île.

A l'inverse, le tenrec, chez qui aucun portage rénal ni excrétion urinaire n'ont pu être mis en évidence, ne semble pas constituer un hôte significatif de la bactérie. Pourtant, les tenrecs sont sympatriques des rats, musaraignes, voire des chiens errants, dans les zones rurales et dans les forêts. Leur milieu de vie est donc contaminé par l'urine des animaux réservoirs et excréteurs de *Leptospira*. Des sérologies positives ayant été établies chez des tenrecs examinés à l'occasion de cette étude et au cours d'une étude antérieure [78] (voir article en **Annexe K**), on peut affirmer que cette espèce peut être contaminée par *Leptospira*, qu'elle développe une réaction immunitaire à son égard, mais que les souches contaminantes ne s'installent pas durablement au niveau rénal. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- L'infection est létale chez les tenrecs et peu d'individus survivent à l'infection ;
- La réponse immunitaire chez le tenrec permet l'élimination complète des leptospires et empêche la colonisation rénale ;
- Les souches de *Leptospira* circulant actuellement à La Réunion pourraient-elles ne pas être adaptées à l'hôte *T. ecaudatus* ?

3.1.3. Chiens et chats errants

Rappel des résultats (Annexe I, Tableaux 6 et 7)

Chiens

Séroprévalence : 23/50 (46,0%)

Prévalence du portage rénal : 7/24 (29,2%)

Charge bactérienne rénale : $1,9 \times 10^3 (\pm 3,0 \times 10^3)$ copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 2/27 (7,4%)

Chats

Séroprévalence : 8/30 (26,7%)

Prévalence du portage rénal : 6/24 (28,6%)

Charge bactérienne rénale : $4,3 \times 10^2 (\pm 4,7 \times 10^2)$ copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 0/18

Les chiens errants sont considérés comme non vaccinés, les anticorps mis en évidence résultent donc d'infection naturelle. Il n'existe pas de vaccin chez le chat.

Notre étude montre une séroprévalence de 46% chez les chiens, proche de celle estimée par Moutou en 1979 (41%) [75]. Nos résultats confirment ceux de Moutou [75] en montrant que la majorité des anticorps agglutinants chez le chien sont dirigées contre le séro groupe Canicola (43,5% des chiens séropositifs), suivi d'Icterohaemorrhagiae (21,7% des séropositifs).

La séroprévalence trouvée chez les chiens errants à La Réunion est similaire à celle estimée dans d'autres zones tropicales et les sérogroupes mis en évidence sont ceux généralement retrouvés chez le chien dans les autres régions du monde : dans la population de chiens errants à Ankara (Turquie), la séroprévalence a été estimée à 44% ($n=116$) [508] ; dans le milieu des années 80, Brethes *et al.* [509] rapportent une séroprévalence de 59,2% ($n=53$) chez les chiens en Nouvelle-Calédonie (île où la maladie est endémique avec une incidence de 70,25 cas pour 100 000 habitants en 2009), et 39,6% des réactions séropositives sont dirigées contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae ; dans la ville de Merida Yucatan (Mexique), la séroprévalence de la leptospirose a été évaluée à 35% ($n=400$), avec pour principaux sérogroupes circulant Canicola (65% des séropositifs) et Icterohaemorrhagiae (11,4%) [510].

Nous avons mis en évidence que tous les chiens séropositifs pour le séro groupe Canicola présentaient des titres ≤ 800 , probablement témoins d'une infection ancienne [141, 226, 511]. Parmi les cinq chiens séropositifs pour le séro groupe Icterohaemorrhagiae, deux présentaient un titre de 1600, pouvant être associé à une infection en cours ou récente [141, 226, 511]. Les autres sérogroupes circulant chez les chiens étaient Sejroe, Panama, Tarassovi

et Ballum, avec des titres faibles ≤ 400). Le chien est généralement considéré comme réservoir du séro groupe Canicola, tandis qu'il est considéré comme sensible à Icterohaemorrhagiae [73, 311, 334]. Ces deux sérogroupe s étaient historiquement les plus fréquemment retrouvés chez le chien, mais les données épidémiologiques mondiales sur la leptospirose canine montrent que d'autres sérogroupe s sont impliqués dans les atteintes cliniques et asymptomatiques chez les canidés [334, 443, 512].

A La Réunion, la circulation chez les chiens errants de sérogroupe s non inclus dans le vaccin bivalent disponible en France²⁰ laisse supposer la transmission possible de *Leptospira* pathogènes chez les canidés, contre lesquelles les animaux domestiques ne sont pas vaccinés.

Comme cela a été démontré dans d'autres régions du monde [308, 309, 310, 312, 313, 317, 443], à La Réunion, le chien semble être un réservoir de *Leptospira*, notamment du séro groupe Canicola et Icterohaemorrhagiae, pouvant être à l'origine de la contamination de l'Homme, principalement par voie indirecte.

Nous montrons que la séroprévalence chez les chats est moins élevée que celle observée dans l'espèce canine, avec 26,7% de séropositifs. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de sérogroupe s majoritaires chez les chats car les réactions sérologiques à plusieurs sérogroupe s (co-agglutinations non spécifiques ou réactions croisées) sont les plus fréquentes (7/8 des chats séropositifs), alors qu'au contraire chez les chiens errants, nous n'avons pas observé de réactions de coagglutination. Chez les chats, nous montrons que les titres en anticorps sont faibles (100 à 400) ce qui peut signifier soit qu'il s'agit d'infections anciennes, soit que la réponse immunitaire du chat est faible envers *Leptospira*.

Le rôle épidémiologique du chat dans la transmission de la leptospirose a été peu étudié et reste très controversé [311, 354, 357, 513]. La présence d'anticorps dirigés contre *Leptospira* a été décrite chez le chat en Espagne [479], en Ecosse [356], en Egypte [354], en Iran [353] et aux Philippines [352]. Les résultats du MAT montrent que 13,6% ($n=53$) des chats en Espagne sont séropositifs pour les sérogroupe s Ballum ou Icterohaemorrhagiae (au seuil 1:100) [479], tandis que 9,2% ($n=87$) des chats étaient séropositifs en Ecosse [356]. En Iran la séroprévalence de la leptospirose a été évaluée à 27% ($n=111$) chez des chats errants et domestiques, avec des taux d'anticorps allant de 100 à 600 [353]. Les sérogroupe s Canicola et

²⁰ Ce vaccin bivalent protège contre les sérogroupe s Icterohaemorrhagie et Canicola.

pomona sont retrouvés par MAT chez les chats errants, tandis que les sérogroupes Sejroe (sérovar Hardjo), Icterohaemorrhagiae et Grippotyphosa sont retrouvés chez les chats domestiques [353]. En Egypte [354] l'étude sérologique porte sur seulement deux chats et montre la présence de co-agglutinations chez l'un d'eux avec les titres suivants : Grippotyphosa (3200), Hardjo (400), Patoc (200) et Canicola (100).

Ces différentes études montrent 1/ une grande variabilité dans les sérogroupes circulant chez les chats, 2/ que les titres en anticorps sont généralement peu élevés, et 3/ l'existence possible d'infection par plusieurs sérogroupes au cours de la vie de l'animal.

Nous retrouvons la même diversité de sérogroupes circulant chez les rats noirs (voir plus haut) et chez les chats errants. Une explication possible serait que divers sérogroupes de *Leptospira* circulent au sein de ses deux espèces et qu'il existe une transmission du chat au rat et *vice versa* par le biais des relations trophiques proie-prédateur qui lient rats et chats. Les animaux peuvent être infectés par plusieurs sérogroupes au cours de leur vie contre lesquels ils fabriquent des anticorps spécifiques [514].

Les prévalences de portage rénal sont très proches chez les chiens et les chats errants, avec 29,2% de chiens identifiés comme porteurs et 28,6% de chats. Les moyennes des charges bactériennes rénales ne sont pas significativement différentes. Enfin, l'excrétion urinaire n'a été mise en évidence que chez les chiens, avec 7,4% des échantillons positifs pour la présence de *Leptospira*. Un seul chien présentait simultanément des leptospires au niveau rénal et urinaire.

Une étude conduite en 1971 aux Philippines décrit l'isolement de leptospires du séro groupe Grippotyphosa par culture d'urine d'un chat présentant des signes cliniques (hyperthermie et ictère) [352]. La littérature récente ne démontre pas de façon claire le rôle du chat en tant qu'hôte réservoir de *Leptospira*. Nos travaux montrent sans ambiguïté, grâce à la répétition des PCR dans des runs différents, à l'utilisation d'amorces et d'une sonde d'hydrolyse très spécifiques, et à la séparation physiques et temporelles des étapes d'extraction et d'amplification, que 28,6% des chats étudiés sont porteurs de leptospires au niveau rénal.

Nous pensons que les chats errants jouent un rôle épidémiologique dans la contamination environnementale par *Leptospira* à La Réunion.

Alors que les estimations de prévalence du portage rénal étaient similaires chez les chiens et les chats errants, nous n'avons pas mis en évidence d'excrétion urinaire de

leptospires chez le chat. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- Parmi les six chats démontrés comme porteurs au niveau rénal, le prélèvement urinaire n'a été faisable que sur trois. L'excrétion des leptospires étant intermittente chez les animaux réservoirs [9, 13], il est probable que ces trois individus, n'étaient pas en phase d'excrétion au moment du prélèvement ;
- La quantité de leptospires excrétée dans les urines des trois chats positifs par qPCR sur tissu rénal était en-dessous du seuil de détection de notre qPCR.

Nos observations chez le chat nécessitent d'être approfondies, notamment il est nécessaire d'obtenir des données sur un plus grand nombre d'individus et de mettre en évidence l'excrétion urinaire.

Notre étude prouve que les carnivores errants sont très exposés aux leptospires pathogènes dans leur environnement (séroprévalence de 46,0% chez les chiens, 26,7% chez les chats). Le mode de vie errant, le contact fréquent avec des zones humides, et la consommation de charogne et de rongeurs [175, 322] favorisent le contact avec *Leptospira*. Nous montrons aussi que l'infection est la plupart du temps subclinique chez les carnivores errants puisque 29,2% des chiens et 28,6% des chats sont réservoirs de la bactérie, tandis que ces animaux ne présentaient pas de signes cliniques visibles de maladie ni de lésions rénales observables à l'œil nu.

Nous ne mettons pas en évidence d'association significative entre la séropositivité ou le portage rénal de *Leptospira* chez les carnivores errants et les facteurs de risque "âge" et "sexe". Nos résultats sont en accord avec les études sur les chiens de Raghavan *et al.* [515], Alton *et al.* [344] et Aslantas *et al.* [508]. Ces résultats sont néanmoins en contradiction avec d'autres études qui montrent l'existence d'un groupe d'âge "à risque", 4-6,9 ans [272] et < 1 an et > 8 ans [263] ou démontrant que le taux de séropositivité chez les mâles est supérieur à celui des femelles [516]. Nous supposons que ces différences sont principalement dues à des variations dans les méthodes d'échantillonnage. Nos analyses statistiques montrent qu'à La Réunion, les facteurs âge et sexe ne sont pas des facteurs de risque de leptospirose chez les carnivores errants et que le risque est le même quels que soient l'âge et le sexe.

Au Canada et aux Etats-Unis les cas de leptospirose canine montre une saisonnalité marquée, fonction de la pluviométrie [267, 515]. En saison pluvieuse, l'incidence de la leptospirose canine est plus élevée car l'environnement est favorable au maintien des leptospires dans l'environnement [267, 515] et les inondations sont des facteurs de risque significatifs de leptospirose canine [171, 272, 517, 518]. Notre étude montre que pour une même période de l'année (nos prélèvements sur les carnivores errants ont été conduits en saison sèche, entre mai et juillet 2009), la zone de vie (est ou ouest) n'est pas un facteur de risque de leptospirose chez les chiens et chats errants. Il est probable que l'incidence de la leptospirose soit plus élevé chez les chiens (et les chats) lors de la saison des pluies.

En conclusion, s'il y a, comme chez l'Homme [156], une variation de l'incidence de la maladie en fonction de la pluviométrie chez les chiens errants, il serait envisageable de conduire sur les chiens domestiques des campagnes de vaccination ciblée, c'est-à-dire juste avant la/les périodes à risque ce qui permettrait de réduire le taux d'incidence et l'installation des leptospires au niveau rénal chez des chiens domestiques, qui représentent un risque zoonotique majeur [320, 339]. On peut aussi envisager d'effectuer un rappel tous les six mois chez les chiens vivant à l'est alors qu'une seule injection avant la saison des pluies serait suffisante chez les chiens vivants à l'ouest (à condition bien entendu que ces chiens ne soient pas promenés ou ne chassent pas dans des zones humides).

3.1.4. Animaux d'élevage

Notre étude constitue le premier état des lieux concernant la leptospirose chez les ruminants d'élevage autres que bovins (cerfs *Rusa* et chèvres). Nous ne discuterons pas des résultats obtenus sur les ovins du fait du très faible échantillonnage effectué pour cette espèce.

Les ruminants peuvent être des réservoirs de *Leptospira* et excréter la bactérie dans l'environnement [383, 460, 519]. La contamination des animaux d'élevage se fait autour des points d'eau, naturels ou artificiels, dont l'environnement direct est humide et favorise la survie de *Leptospira*. De plus, les points d'eau sont des lieux de rassemblement des animaux permettant la transmission (directe ou indirecte) entre les individus [520, 521, 522]. L'introduction d'un animal infecté au sein d'un élevage est un facteur de risque d'introduction de la leptospirose dans une exploitation. De plus, le type d'élevage (allaitant ou laitier, intensif ou extensif...), la présence d'animaux sauvages dans les alentours de l'élevage, et les

conditions environnementales sont des facteurs déterminants pour la dissémination de l'infection [523].

Les rongeurs (et autres micromammifères) vivant dans l'élevage et en périphérie sont des réservoirs de leptospires pour le troupeau [383], de même que les chiens errants [359, 524], et probablement aussi les chats (cf. notre étude). De plus, l'élevage constitue une source permanente de recontamination pour ces hôtes réservoirs, permettant ainsi le maintien du cycle.

La littérature montre qu'il reste très difficile de mettre en évidence des facteurs de risques épidémiologiques d'infection par *Leptospira* au sein des exploitations, et que ces facteurs de risques sont très variables en fonction du type d'étude, des pratiques d'élevage et de la localité [380, 388, 525].

Pour des raisons principalement techniques, nous n'avons pas étudié l'excrétion urinaire chez les animaux de rente. Néanmoins, la présence de leptospires au niveau rénal est considérée comme un témoin de l'excrétion urinaire (intermittente ou continue).

3.1.4.1. Bovins

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau 8)

Séroprévalence : 30/87 (34,5%)

Prévalence du portage rénal : 14/76 (18,4%)

Charge bactérienne rénale : $8,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

En France les bovins ne sont pas vaccinés, les anticorps détectés dans notre étude résultent par conséquent d'infections naturelles. Nous montrons que lors de l'abattage 34,5% des bovins abattus à l'abattoir de Saint-Pierre sont séropositifs pour *Leptospira* et que 18,2% d'entre eux sont porteurs de leptospires au niveau rénal, donc potentiellement excréteurs [460], sans qu'ils présentent de symptômes cliniques.

Ces résultats montrent que la leptospirose est une maladie qui circule de façon intense au sein du cheptel bovin réunionnais.

L'infection chez les bovins a été classée en deux groupes étiologiques : le premier, dû aux souches adaptées aux bovins (*L. borgpetersenii* séro groupe Sejroe sérovar Hardjo), et un second groupe dû aux souches "accidentelles" dont les hôtes réservoirs sont les animaux

domestiques ou sauvages [526]. En 2003, H. Gares [77] montrait déjà que Sejroe était le séroroupe prédominant en élevage bovin laitier à La Réunion et qu'il était responsable d'avortements dans cette filière ; en 2009, ce séroroupe est retrouvé chez 56,6% (17/30) des bovins séropositifs à des titres compris entre 100 et 3200, et presque la moitié de ces animaux (8/30) présentaient un titre ≥ 800 pour le séroroupe Sejroe (**Tableau 15**). Nous considérons qu'un titre ≥ 800 chez des animaux non vaccinés témoigne d'une infection récente ou en cours. Les autres sérogroupe identifiés par MAT chez les bovins (à des titres ≤ 400) étaient Canicola (1/30), Panama (2/30), Pyrogenes (2/30), Tarassovi (1/30) et Ballum (1/30) ; 20% (6/30) des bovins présentaient des agglutinations pour plusieurs sérogroupe.

Sejroe a aussi été retrouvé chez le rat noir et le rat surmulot. Les autres sérogroupe identifiés chez les bovins ont aussi été retrouvés chez les chiens, les chats, les rats. Il est possible que ces espèces soient des réservoirs de leptospires et des sources de contamination (et de recontamination) pour les élevages bovins. Ils peuvent aussi transporter les leptospires entre des élevages et disséminer ainsi la maladie.

Le séroroupe Sejroe est aussi l'un des quatre sérogroupe les plus fréquemment identifié par MAT chez les patients à La Réunion [416] et on peut suspecter que les bovins, réservoirs principaux de ce séroroupe sur l'île, sont impliqués dans la contamination humaine [527, 528, 529].

La séroprévalence en élevage bovin est très variable en fonction des pays (et dans un même pays en fonction des zones géographiques [530, 531, 532]), du type de production, du type d'enquête et du seuil de positivité choisi. C'est pourquoi, une comparaison de notre séroprévalence avec celles présentées dans d'autres régions du monde chez les bovins est impossible. Néanmoins, nous présentons ici quelques résultats d'études sérologiques conduites en zones tropicales qui permettent de mieux cerner l'importance et l'impact potentiel de la leptospirose chez les bovins dans d'autres régions, ainsi que les sérogroupe circulant. Comme à La Réunion, dans la majorité des pays, le séroroupe Sejroe reste généralement le séroroupe prédominant dans l'espèce bovine :

Au Sri Lanka, une étude montre une séroprévalence de 20,3% (n=113) dans des petits élevages laitiers, avec une prédominance du séroroupe Sejroe (73,9% des séropositifs) [383]. A Trinidad, 21,5% (n=590) des bovins sont séropositifs, *Icterohaemorrhagiae* étant le séroroupe dominant [392] ; en Tanzanie, Schoonman et Swai [388] rapportent une

séroprévalence de 30,3% (n=654) et le sérovar Hardjo (sérogroupe Sejroe) représente 49,5% des séropositifs ; au Mexique, dans la vallée de Toluca, la séroprévalence de la leptospirose chez les bovins laitiers a été estimée à 10,3% et les sérogroupe majoritairement retrouvés étaient Sejroe et Canicola [523]. Au Brésil, une enquête sur 2343 sérums bovins a montré une séroprévalence de 16% envers le sérovar Hardjo (sérogroupe Sejroe) [525], tandis qu'une autre enquête montre une séroprévalence de 46,9% (n=379) dans les élevages laitiers d'une autre région de ce pays [386], et qu'une troisième enquête rapporte une séroprévalence de 47,6% (n=464) dans une autre région [533]. En Iran, la séroprévalence de la leptospirose chez les bovins prélevés à l'abattoir a été évaluée à 37,8% (n=98) [534]. Enfin, une étude au Texas a montré que 44% (n=106) des bovins abattus à l'abattoir excrétaient des leptospires dans leurs urines [519].

Chez les ruminants, l'infection par *Leptospira* provoque des pertes primaires au niveau de l'élevage puisqu'elle est responsable d'une diminution des performances de reproduction : avortements [535, 536] (dus notamment au sérogroupe Sejroe sérovar Hardjo [77, 537]), mort-nés, prématurés [394]) ; et secondaires par diminution de la qualité et de la quantité de lait produit [399].

Les pertes économiques engendrées par la maladie en élevages laitiers et allaitants et le manque à gagner des éleveurs sont probablement sous-estimés sur l'île [538]. Il est aujourd'hui très important d'informer les éleveurs et de diagnostiquer la maladie de façon systématique dans les élevages afin de mettre en place des mesures de lutte appropriées.

Il est important de prendre en compte que l'infection chez les bovins est le plus souvent chronique, et lors d'avortement, on observe rarement une augmentation du titre en anticorps, au contraire, ce titre chute dans la majorité des cas [9]. Ainsi, la mise en évidence de *Leptospira* comme facteur d'infertilité ou d'avortement est difficile au niveau individuel et doit se faire à l'échelle du troupeau.

La charge rénale chez les bovins dans notre étude a été estimée à $8,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein, ce qui n'est statistiquement pas différent de la charge bactérienne rénale retrouvée chez les chiens, les chats, les cerfs, les chèvres et les truies. Nos travaux sont les premiers à rapporter la charge bactérienne rénale chez des animaux de rente

infectés naturellement. Nous ne disposons par conséquent pas à ce jour d'études comparatives pour discuter nos résultats.

Compte-tenu de l'importance du cheptel réunionnais (32 000 animaux allaitants et 3 700 vaches laitières), compte-tenu du volume urinaire théorique d'un bovin (18 litres/24h [539]), de la prévalence importante du portage rénal (18,4%) et de la charge bactérienne rénale ($8,8 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^3$ copies de génome/mg de rein), et même si l'excrétion urinaire est intermittente, nos résultats démontrent que les bovins contribuent de façon importante à la contamination de l'environnement (notamment des zones rurales) par *Leptospira*.

Comme nous le montrons à La Réunion, deux études rapportent qu'au Brésil les jeunes bovins (< 7 mois) ont moins de chance d'avoir été en contact avec *Leptospira* que les bovins plus âgés [525, 530]. En Tanzanie, l'âge à partir duquel le risque de séropositivité est significativement plus élevé chez les bovins est 6 ans [388]. Ainsi, dans les élevages bovins, le risque d'infection augmente avec l'âge de l'animal.

Nous observons que les bovins allaitants réunionnais sont plus touchés par la maladie que les élevages laitiers, ce qui confirme les observations de Prescott *et al.* [537] en Ontario (Canada) où les élevages allaitants sont significativement plus touchés que les élevages laitiers, notamment par le sérovar Hardjo. D'autres études montrent cependant l'inverse, avec une contamination plus importante des élevages laitiers par rapport aux élevages allaitants [380, 540]. Nous pensons que ces résultats sont très dépendants du protocole de l'étude, de la zone étudiée, des facteurs d'élevage, mais aussi des méthodes d'investigation de la maladie et d'analyse statistique.

Notre étude rapporte qu'un bovin a 5,37 (OR) fois plus de chance d'être séropositif s'il est porteur rénal et *vice versa* ($p = 0,008$; IC 95% [1,54 - 21,99]). Les hypothèses liées à cette observation sont les suivantes :

- la persistance des anticorps est très longue et co-existe avec l'infection rénale ;
- et/ou les recontaminations sont fréquentes : à partir de l'environnement (étable, pâture, salle de traite [540], auge, aliments) ou directement par contacts [492], notamment lorsque la densité animale est très importante ou lors de la monte naturelle (mâle reproducteur, porteur de *Leptospira* provenant d'un autre élevage, ou présent au sein même de l'élevage et permettant le maintien de la

maladie dans le troupeau). Ces ré-infections stimulent de façon continue le système immunitaire et la synthèse d'anticorps.

L'insémination artificielle compte pour 95% des fécondations en élevage laitier à La Réunion (environ 5% de saillies naturelles en élevage laitier) [541], c'est l'inverse en élevage allaitant où la saillie naturelle est de règle. La législation sanitaire française en matière de reproduction animale s'appuie sur la législation européenne (directive 88/407/CEE) qui définit notamment les règles sanitaires et d'hygiène à respecter dans la préparation et le stockage des semences. Les paillettes utilisées à La Réunion proviennent de l'Union Européenne où elles sont obtenues dans des centres de collecte de semence agréés. Il n'y a pas d'exigence additionnelle pour l'introduction à La Réunion. Les antibiotiques énumérés ci-après doivent être ajoutés pour l'obtention dans le sperme après dilution finale des concentrations suivantes :

Au minimum :

- 500 µg de streptomycine par ml de dilution finale,
- 500 UI de pénicilline par ml de dilution finale,
- 150 µg de lincomycine par ml de dilution finale,
- 300 µg de spectinomycine par ml de dilution finale.

Une combinaison différente d'antibiotiques ayant un effet équivalent contre *Campylobacter*, *Leptospira* et *Mycoplasma* peut être utilisée.

L'ajout d'antibiotiques dans le sperme utilisé en insémination artificielle garantit la non transmission de la leptospirose par ce mode de reproduction. Néanmoins, en élevage allaitant à La Réunion, le risque de transmission de la maladie par la monte naturelle et de son maintien dans le troupeau notamment par le biais du taureau reproducteur est non négligeable.

En conclusion, il semble que l'origine de la contamination des bovins soit multiple :

- Contamination directe intra-élevage par les urines [460],
 - Contamination indirecte [522] par l'environnement, dans le bâtiment si présence de zones humides, ou dans les pâturages au niveau des points d'eau, des retenues d'eau ou par le sol humide [388], ou si la pâture est partagée avec d'autres espèces, notamment des porcs [386],
 - Contamination directe et indirecte par les rats, réservoirs potentiels du séro groupe Sejroe, et circulant dans l'élevage et entre les élevages, mais aussi par les carnivores domestiques ou errants [542],
- Contamination par la monte naturelle [400, 543].

3.1.4.2. Caprins

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau 9)

Séroprévalence : 36/60 (60%)

Prévalence du portage rénal : 13/49 (26,5%)

Charge bactérienne rénale : $9,2 \times 10^2$ ($\pm 7,8 \times 10^2$) copies de génome/mg de rein

L'élevage caprin représente une filière importante (culturellement et numériquement) à La Réunion et la consommation de "cabri", en viande fraîche ou congelée est courante sur l'île. Notamment associée aux fêtes, cette viande, de coût modéré, est consommée régulièrement dans les familles créoles. L'élevage caprin est surtout familial. Tous les animaux ne sont pas déclarés, et certains élevages atteignent plusieurs centaines de têtes. La production d'animaux pour le sacrifice est aussi relativement importante. L'élevage caprin laitier est par contre très peu développé sur l'île.

Notre étude montre une séroprévalence très élevée (60,0%) en élevage caprin et une prévalence du portage rénal de 26,5%, démontrant que les chèvres sont des réservoirs de leptospires, comme l'ont montré précédemment des recherches dans d'autres régions du monde [138, 544]. Des études expérimentales ont prouvé que les chèvres étaient sensibles à l'infection par plusieurs sérovars de *Leptospira* [545, 546], mais que la majorité des infections était asymptomatique.

Par conséquent, il semble que la leptospirose soit une maladie majeure, asymptomatique, chez ces petits ruminants à La Réunion.

Nous montrons que le séro groupe Panama est largement prédominant chez les caprins à La Réunion, représentant 69,4% des animaux séropositifs, suivi du séro groupe Pyrogenes (25% des séropositifs). Un seul animal était séropositif contre le séro groupe Autumnalis; ce séro groupe ayant été mis en évidence uniquement chez cet animal parmi toutes les espèces étudiées, nous pensons que cette réaction d'agglutination est non spécifique. Enfin, 11,1% des caprins présentaient une agglutination pour plusieurs séro groupes. Parmi les autres animaux de notre échantillonnage, Panama a aussi été retrouvé chez le rat surmulot, le chien, le chat, les bovins, le cerf, et le porc, tandis que Pyrogenes, non retrouvé chez les micromammifères ou les carnivores errants, ne circule que chez les animaux de rente.

Nos résultats suggèrent que les caprins sont réservoirs des sérogroupes Panama et Pyrogenes à La Réunion.

L'introduction de leptospires dans un élevage peut se faire par l'introduction d'un caprin excréteur (non testé à l'introduction et sans respect d'une période de quarantaine) ou par l'intermédiaire des animaux sauvages ou errants. Par ailleurs, la littérature rapporte qu'il existe une différence significative de risque d'infection par *Leptospira* entre les élevages mixtes, c'est-à-dire présentant plusieurs espèces (caprins, bovins, porcins) et les élevages n'ayant qu'un seul type de production [547]. Il semble donc que les élevages multi-espèces doivent faire l'objet d'une surveillance et de mesures de prévention accrues.

La séroprévalence en élevage caprin à La Réunion est très élevée par rapport aux séroprévalences rapportées chez les chèvres dans d'autres régions du monde : A Trinidad, la séroprévalence chez les caprins est faible, avec 3,3% (n=180) d'animaux séropositifs [392]. Dans la région du sud du Tyrol en Italie, la prévalence chez les caprins est aussi faible puisqu'elle a été estimée à 2,1% (n=95) [403]. Une enquête sérologique dans différentes îles situées dans la mer des Antilles (St-Martin, St-Kitts, Nevis, Antigua, Montserrat, Guadeloupe, Dominique, Martinique, Ste-Lucie, St-Vincent, Grenade, Caniacou, et La Barbade) montre que 7,2% (n=579) des caprins présentent des anticorps contre *Leptospira* (à un titre ≥ 100). La plus forte séroprévalence a été retrouvée à St-Vincent, où 23% (n=48) des caprins étaient séropositifs. Dans ces îles, les sérogroupes circulant majoritairement chez les caprins sont Autumnalis, Grippytyphosa, Cynopteri et Icterohaemorrhagiae [548]. Au Brésil, Lilenbaum *et al.* [404] montrent une séroprévalence de 20,9% (n=248) en élevage caprin, tandis qu'une autre étude rapporte une séroprévalence de 31,3% (n=230) dans une autre région du pays [547]. Pourtant, en Jamaïque, la séroprévalence de la leptospirose en élevage caprin a été estimée à 62% [549], proche de celle observée à La Réunion.

Comme chez les bovins, l'infection par *Leptospira* est une cause d'avortement chez les caprins [550]. Il n'existe pas de vaccin ayant une AMM en France et la prophylaxie doit passer obligatoirement par des mesures de prévention sanitaires. Considérant le fort taux de portage rénal (26,5%), les pertes économiques liées à la leptospirose sont probablement importantes dans l'élevage caprin réunionnais [538]. Une étude portant sur les facteurs d'infertilité dans les exploitations caprines serait intéressante car elle permettrait d'identifier la proportion d'avortements liés à la leptospirose et de les différencier des épisodes abortifs liés à

d'autres maladies circulant dans les élevages caprins de l'île, notamment fièvre Q et chlamydiafilose. De plus, la leptospirose peut se transmettre par la semence [404], et les échanges de boucs reproducteurs entre élevages, pratique courante à La Réunion, constituent un risque d'introduction de la maladie dans un troupeau.

Nous avons évalué la charge bactérienne rénale moyenne chez les animaux porteurs de *Leptospira* à $9,2 \times 10^2$ ($\pm 7,8 \times 10^2$) copies de génome/mg de rein. Nous n'avons pas cherché à démontrer l'excrétion urinaire de leptospires dans l'espèce caprine, mais la littérature rapporte que les caprins infectés par *Leptospira* sont excréteurs de la bactérie dans leurs urines [138]. De plus, le contact avec des caprins a été déterminé comme étant un facteur de risque d'infection par la leptospirose chez les patients atteints [551]. Par conséquent, la contribution des caprins à la contamination environnementale n'est pas négligeable, en particulier en zone rurale.

Du fait de l'importance numérique des petits élevages caprins familiaux à La Réunion et du manque de suivi sanitaire dans ces élevages, la leptospirose caprine en tant que zoonose doit être prise en considération dans la lutte contre la maladie chez l'Homme.

Comme dans l'étude de Dos Santos *et al.* [547], nous ne démontrons pas de différence significative d'infection ou de portage rénal entre les mâles et les femelles. Nous avons effectué des prélèvements uniquement sur des animaux adultes et n'avons pas pu vérifier l'influence du facteur âge sur le statut des animaux vis-à-vis de la leptospirose mais au Brésil, l'âge a une influence sur le statut sérologique des caprins, et les animaux adultes ont plus de chance d'être séropositifs que les jeunes.

3.1.4.3. Cerfs *Rusa*

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau 11)

Séroprévalence : 21/34 (61,8%)

Prévalence du portage rénal : 6/32 (18,7%)

Charge bactérienne rénale : $2,9 \times 10^3$ ($\pm 3,7 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

A la différence des élevages bovins et caprins, l'élevage de cerfs *Rusa* est peu développé sur l'île. De plus, il existe peu d'animaux à l'état sauvage.

Avec une séroprévalence de 61,8%, les cerfs sont l'espèce de rente ayant la séropositivité la plus élevée sur l'île.

Le sérogroupe Panama représente 38,1% (8/21) des réactions séropositives chez le cerf Rusa, tandis que Pyrogenes compte pour 23,8% (5/21). Les autres sérogroupe circulant chez les cerfs sont Icterohaemorrhagiae et Mini, représentant 9,5% (2/21) et 4,8% (1/21) des sérologies positives respectivement. Chez les cervidés, nous avons observé que 23,8% (5/21) des réactions sérologiques positives étaient dirigées contre plusieurs sérogroupe. Les titres en anticorps restent relativement faibles dans cette espèce (**Tableau 15**) avec un titre maximum de 800 retrouvé contre le sérogroupe Mini, témoin d'une infection aiguë ou assez récente, alors que les titres en anticorps dirigés contre Pyrogenes ne dépassent pas 100, ceux contre Panama restent ≤ 200 , et ceux dirigés contre Icterohaemorrhagiae ≤ 400 .

Nous avons montré une séroprévalence très élevée dans notre échantillon et l'absence de réaction sérologique envers le sérogroupe Sejroe chez le cerf Rusa alors que les cervidés sont généralement considérés comme réservoir de ce sérogroupe [552, 553, 554, 555]. Nos résultats sont très différents de ceux rapportés par d'autres études sur cette espèce : la séroprévalence de la leptospirose chez le cerf Rusa en Australie a été estimée à 25% ($n=12$) avec des titres en anticorps allant de 128 à 1024, principalement dirigés contre le sérovar Hardjo (sérogroupe Sejroe) [552]. Chez les cervidés en Nouvelle-Zélande, la séroprévalence a été évaluée à 31,1% [554] et Hardjobovis est le sérovar prédominant chez les cervidés dans ce pays [554, 555], suivi de Icterohaemorrhagiae [554]. En Nouvelle-Calédonie, le cerf Rusa est considéré comme réservoir de *L. borgpetersenii* sérogroupe Sejroe sérovar Hardjobovis [553].

Chez les cerfs la séropositivité n'est pas corrélée au portage rénal et, bien que la séroprévalence soit élevée (61,8%) les titres en anticorps sont faibles (100 à 200 pour la majorité des animaux). Par conséquent :

- Soit les réinfections ne sont pas fréquentes chez ces animaux et les faibles taux d'anticorps sont le reflet d'infections anciennes ;
- Soit la réponse immunitaire du cerf Rusa envers *Leptospira* est faible lors d'une infection ;
- Soit le taux d'anticorps baisse rapidement après l'infection.

Le taux de portage rénal est faible (18,8%) ce qui suggère que les animaux contaminés éliminent la bactérie et qu'elle ne persiste pas dans le rein (les recontaminations étant probablement peu fréquentes, l'installation au niveau rénale n'est pas renouvelée).

Les principaux sérogroupes circulant chez les cerfs sont Panama et Pyrogenes. Les titres faibles associés à une prévalence du portage rénal de 18,8% montrent que *Leptospira* circule probablement à bas bruit dans les élevages de cervidés.

Nous avons investigué deux exploitations pour notre étude : l'élevage du Tampon (situé au 23^{ème} km) au sein duquel l'élevage de cervidés est conduit de façon semi-extensive, et l'élevage de Saint-Leu où l'élevage peut être qualifié d'intensif (en bâtiment) dans. L'analyse statistique nous montre qu'un animal élevé au 23^{ème} km a plus de chance d'être séropositif qu'un animal élevé à Saint-Leu ($p = 0,008$; $OR = 7.20$; $IC\ 95\% [1,64 - 37,87]$). Saint-Leu présente un climat plus sec que le 23^{ème} km, et l'environnement des cerfs est par conséquent moins favorable à la survie de *Leptospira* que l'environnement des animaux élevés au 23^{ème} km (qui est une région pluvieuse). Par conséquent, si l'élevage intensif favorise la transmission directe des leptospires au sein du troupeau, l'élevage semi-extensif de plein air favorise plutôt la contamination indirecte *via* l'environnement.

Néanmoins, comme nous l'avons exposé précédemment, des facteurs zootechniques peuvent, en plus du facteur climatique ou type d'élevage, rentrer en jeu pour expliquer cette différence. Enfin, il faut noter que le facteur de risque "élevage" n'est pas significatif dans la recherche des facteurs de risque de portage rénal chez les cervidés.

3.1.4.4. Porcins

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau 12)

Séroprévalence : 43/89 (48,3%, un seul verrat dans l'échantillon)

Prévalence du portage rénal : 13/83 (15,6%)

Charge bactérienne rénale : $8,6 \times 10^2 (\pm 1,7 \times 10^3)$ copies de génome/mg de rein

Nous montrons qu'à La Réunion 47,7% des truies de reproduction abattues à l'abattoir lors de notre enquête étaient séropositives vis-à-vis de la leptospirose. Le seul verrat testé était lui aussi séropositif et présentait des anticorps contre les sérogroupes Ballum et Panama.

Parmi les truies séropositives, le séro groupe Panama est celui le plus fréquemment mis en évidence par MAT, avec 38,1% (16/42) des réactions positives, tandis que Pyrogenes

représente 26,2% des réactions positives (**Tableau 14**). D'autres sérogroupes sont mis en évidence chez les truies : Icterohaemorrhagiae, Cynopteri et Mini représentant chacun 4,8% (2/42) des séropositifs, et Ballum, comptant pour 2,4% (1/42) des sérologies positives. De plus, 19% (8/42) des truies séropositives ont des anticorps dirigés contre plus d'un séro groupe, témoignant d'infections multiples et/ou de réactions croisées.

Enfin, nous notons que les titres en anticorps déterminés par MAT sont assez faibles puisque tous compris entre 100 et 400 (**Tableau 15**), avec 25/42 (59,5%) animaux positifs au titre 100.

Ces résultats montrent que la leptospirose est endémique chez les truies de reproduction à La Réunion.

La séoprévalence de la leptospirose porcine est extrêmement variable en fonction des études. Une enquête sérologique conduite en Thaïlande en 2004-2005 a montré que 10% des truies échantillonnées ($n=400$) présentaient une réaction sérologique positive envers *Leptospira* et Grippotyphosa représentait 55% des réactions positives [556]. Dans la municipalité de Morogoro (Tanzanie), la séoprévalence de la maladie a été estimée dans les petits élevages et élevages familiaux, à 4,4% ($n=385$). Ni l'âge ni le sexe de l'animal n'ont pu être mis en évidence comme facteurs de risque de séropositivité [406]. Au Belize, 28% ($n=71$) des porcs testés par MAT étaient séropositifs au seuil de 1:100, Australis étant le séro groupe prédominant, suivi d'Autumnalis et Icterohaemorrhagiae [557]. Au Vietnam, Boqvist *et al.* [408] rapportent une séoprévalence par MAT de 73% ($n=424$) chez les truies de reproduction, avec un seuil de séropositivité de 1:100 et Bratislava est le séovar majoritaire [408]. En Malaisie, pays voisin du Vietnam, Bahaman *et al.* [558] rapportent une séoprévalence de 16,1% ($n=139$) chez les porcs à l'engrais et le séogroupe Pomona est le plus fréquemment retrouvé. A Trinidad, la séoprévalence chez les porcs est de 5,5% ($n=200$) [392]. Par ailleurs, il semble que la séoprévalence soit variable chez les porcs, en fonction des années, et au cours d'une même année [558], notamment si les animaux sont élevés en plein air [559].

Nous rapportons une prévalence du portage rénal de 15,6% chez les truies de réforme, sans corrélation entre séropositivité et portage rénal dans cette espèce. Ces résultats, associés au faibles titres d'anticorps, montrent que, si presque la moitié des animaux a été en contact

avec *Leptospira*, l'infection est probablement ancienne (ces animaux sont en moyenne âgés de 5 ans) et le portage rénal très probablement chronique.

Leptospira est impliqué dans des troubles chroniques de la fertilité chez les porcs, notamment des avortements chez les truies [137, 405], la naissance de prématurés ou de porcelets momifiés, des mortalités néonatales [405, 560], mais aussi des retours en chaleurs après la première insémination [561], et une diminution de la taille des portées [405, 562].

A la Réunion, les pertes économiques liées à *Leptospira* sont très certainement sous-estimées en élevage porcin. Les troubles de la reproduction sont des pathologies souvent chroniques chez les porcs, circulant à bas-bruit et pouvant avoir des étiologies très diverses. La mise en évidence d'une séroprévalence et d'un portage rénal de *Leptospira* élevés chez les truies de reproduction réunionnaise (à l'étage de production) devrait permettre une prise de conscience de l'importance de cette maladie en élevage porcin.

Au Vietnam, 69% ($n=32$) des porcs abattus à l'abattoir étaient porteurs de leptospires au niveau rénal, mais l'étude montre qu'il n'y a pas d'association entre le statut de porteur rénal et la présence d'anomalies macroscopiques au niveau rénal [563], ce qui montre qu'une observation macroscopique des reins ne permet pas de déterminer le statut de l'animal vis-à-vis de la leptospirose. [564]. Dans le nord-est de la Sicile (Italie), la prévalence du portage rénal chez des porcs élevés en plein air a été estimée par PCR à 33% ($n=90$). Ces deux études rapportent des prévalences de portage rénal très supérieures à celle que nous avons mise en évidence chez les truies de La Réunion.

Au Vietnam, les truies élevées dans des petits élevages ont plus de chance d'être séropositives que celles élevées dans les grands élevages (probablement car les animaux des petits élevages ont plus d'interactions avec des d'autres espèces animales et avec l'environnement que les animaux des plus grandes fermes) [408]. De plus, le contact direct entre les truies favorise la contamination directe *via* les urines entre les animaux [408]. A La Réunion, les truies de réforme abattues à l'abattoir de Saint-Pierre proviennent majoritairement d'élevages naisseurs-engraisseurs hors sol (et non d'élevages familiaux) et ces truies sont élevées en bâtiments. Ces deux critères peuvent expliquer que le taux de portage rénal soit plus bas à La Réunion que celui rapporté dans d'autres études.

3.1.4.5. Discussion sur les sérogroupes Panama et Pyrogenes

Ces deux sérogroupes sont les plus fréquemment identifiés chez les caprins, cerfs et porcins de La Réunion.

Le séro groupe Panama regroupe deux souches appartenant à une seule espèce génomique (*L. noguchii*, sérovar Cristobali souche 1996 K et sérovar Panama souche CZ 214K), toutes deux isolées chez des opossums à Panama [9].

Panama est peu retrouvé chez les patients à La Réunion (un seul patient entre 1998 et 2009 ayant un MAT positif pour ce séro groupe (*données des rapports annuels du Centre National de Références des Leptospires*) et trois patientes positives pour ce séro groupe dans l'enquête épidémiologique conduite en 1987 par Duval *et al.* [201]). Ce séro groupe est responsable de la majorité des cas cliniques au Cambodge (déterminé par MAT) [565], et probablement à l'origine de nombreuses formes subcliniques [565]. Ce séro groupe est aussi retrouvé fréquemment chez les patients au Mexique, avec comme sources supposées d'infection, les rongeurs, les chiens et les porcs [231], ainsi que dans la région du Mekong (Vietnam) où il représente 15,2% des séropositifs (263 personnes ont été trouvées séropositives sur les 1400 testées) [566], et dans les quartiers pauvres de Rio de Janeiro (Brésil) où 3,1% des personnes testées (n=259) présentaient des anticorps contre le séro groupe Panama [200].

Nous montrons que le séro groupe Panama est le séro groupe majoritaire (déterminé par MAT) circulant chez les ruminants d'élevage autres que bovins, les caprins et les cerfs, ainsi que chez les truies de reproduction, alors qu'il est peu retrouvé chez les patients réunionnais.

Le séro groupe Pyrogenes contient des souches d'au moins cinq espèces génomiques (

Tableau 40) [9]. Ce séro groupe est par conséquent très divergent et il a été isolé sur diverses espèces mammaliennes, dont l'Homme. Il est probable que les réservoirs soient variables d'une région à l'autre.

Tableau 40 : Espèces génomiques, sérovars, souches de référence et origine des souches de *Leptospira* appartenant au séro groupe Pyrogenes (d'après [9]).

Espèce	Sérovar	Souche de référence	Source	Origine géographique
<i>L. borgpetersenii</i>	Hamptoni	Hampton	Humain	Malaisie
<i>L. borgpetersenii</i>	Kwale	Julu	Humain	Kenya
<i>L. interrogans</i>	Abramis	Abraham	Humain	Malaisie
<i>L. interrogans</i>	Biggis	Biggis	Humain	Malaisie
<i>L. interrogans</i>	Camlo	LT 64-67	Humain	Vietnam
<i>L. interrogans</i>	Guaratuba	An7705	?	?
<i>L. interrogans</i>	Manilae	LT398	Rat	Philippines
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem	Humain	Indonésie
<i>L. interrogans</i>	Robinsoni	Robinson	Humain	Australie
<i>L. interrogans</i>	Zanoni	Zanoni	Humain	Australie
<i>L. noguchii</i>	Myocastoris	LSU1551	Tatou	Etats-Unis
<i>L. santarosai</i>	Alexi	HS-616	Humain	Porto Rico
<i>L. santarosai</i>	Alexi	Linaires	Humain	Panama
<i>L. santarosai</i>	Bagua	MW-12	Opossum	Pérou
<i>L. santarosai</i>	Cenepa	MW 2	Opossum	Pérou
<i>L. santarosai</i>	Princeton	TRVL112499	Humain	Trinidad
<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	Northrup	Humain	Trinidad
<i>L. santarosai</i>	Sanmartini	CT63	Bovin	Pérou
<i>L. santarosai</i>	Varela	1019	Opossum	Nicaragua
<i>L. weilii</i>	Menglian	S621	Humain	Chine
Espèce incertaine	Nigeria	Vv3JA	?	?

La plupart des souches de référence pour le séro groupe Pyrogenes ont été isolées à partir d'humains et d'animaux sauvages [390], mais les isolements à partir d'animaux domestiques sont peu nombreux. Les réservoirs pour ce séro groupe sont actuellement inconnus, bien qu'il semble circuler en Afrique, notamment chez les bovins [390]. Pyrogenes est le séro groupe majoritaire identifié chez les patients par MAT au Sri Lanka [442] et il a été impliqué dans une épidémie de leptospirose en Martinique [211]. Ce séro groupe est aussi responsable de 10% des cas cliniques diagnostiqués à Mayotte [74]. Le sérovar Zanoni est responsable de nombreux cas humains en Australie [567] où il est associé à la maladie des coupeurs de canne à sucre. Ce sérovar est très commun dans la région nord du Queensland et les principaux hôtes réservoirs sont des marsupiaux (principalement les bandicoots, famille des Peramelidae). Sa circulation a aussi été démontrée chez les bovins laitiers australiens et de nombreux éleveurs laitiers ont été infectés (<http://www.health.qld.gov.au/qhcss/qhss/lepto/documents/zanoni.pdf>). Le sérovar Robinsoni, isolé pour la première fois en 1951 chez un coupeur de canne australien [567], est moins courant sur le continent australien, mais le nombre de cas de leptospirose humaine dus à ce sérovar est en augmentation. Les sources probables d'infection sont les bandicoots, les rats et les porcs sauvages (<http://www.health.qld.gov.au/qhcss/qhss/lepto/documents/robinsoni.pdf>).

Chez les animaux, le sérotype Pyrogenes a été isolé par culture à partir de rein et de sang de rats en Egypte [354]. Il a été identifié la première fois aux Etats-Unis (sérovar Zanon) à partir de rein de ragondin (*Myocastor coypu*) [568]. Il a aussi été isolé chez des bovins au Zimbabwe [569] et en Australie (sérovar Zanon) [570]. Le sérotype Pyrogenes (sérovars Zanon et Robinson) a été isolé chez différents micromammifères australiens (*Isoodon macrourus*, *Melomys lutilus*, *Uromys caudimaculatus*, *Rattus sordidus conatus*, *R. assimilis*, *R. rattus*, *R. norvegicus*, *M. musculus*) [571]. Par MAT, Pyrogenes a été identifié comme circulant dans les populations de chiens en Afrique du Sud [340, 512], au Japon [516], au Mexique [524]... Pyrogenes circule aussi chez les porcs au Mexique bien qu'il ne soit pas le sérotype dominant [572], il est aussi le sérotype principalement identifié par MAT chez les rongeurs et les musaraignes (*S. murinus*) en Thaïlande [445]. En Pologne, il est le sérotype majoritaire retrouvé dans les élevages caprins [439]. Une étude au Portugal rapporte que Pyrogenes est un des sérotypes majeurs identifiés par MAT chez les chèvres (10,7% des séropositifs) et les chevaux (11,4% des séropositifs) [573].

L'importance de ce sérotype identifiée par MAT à La Réunion, notamment chez les caprins, cervidés et porcins, pose la question de sa pathogénicité chez ces espèces.

3.1.6. Petit Molosse de La Réunion (*Mormopterus francoismoutoui*)

M. francoismoutoui est une chauve-souris de la famille des Molossidae, endémique de l'île de La Réunion [432]. L'île abrite une autre espèce de chauve-souris insectivore, retrouvée aussi à l'île Maurice, *Taphozous mauritanus*, qui appartient à la famille des Emballonuridae, mais que nous n'avons pas étudiée.

Seuls trois prélèvements poolés d'urines de microchiroptères (*M. francoismoutoui*) étaient analysables par qPCR (les autres contenaient des inhibiteurs) et tous étaient négatifs pour la présence de *Leptospira*. Ce fort taux d'inhibiteurs (80% des échantillons) montre que la technique d'échantillonnage sur bâche plastique n'était pas optimale et que des contaminations ont eu lieu. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence l'excrétion urinaire de *Leptospira* chez deux individus de *M. francoismoutoui*, à partir de prélèvements individuels d'urine, effectués directement au niveau du méat urinaire.

Pour la mise en évidence de *Leptospira* dans les urines de chiroptères, le prélèvement individuel direct au niveau du méat urinaire est à préférer au prélèvement poolé sur bâche.

Le rôle épidémiologique des chauves-souris dans la transmission et le maintien de la leptospirose est peu documenté. Les études se focalisent principalement sur les animaux domestiques ou les espèces de rongeurs anthropophiles, car très proches de l'Homme, mais les chauves-souris peuvent être des sources potentielles d'infection [574] notamment du fait de leur abondance et de leur proximité avec les animaux domestiques et sauvages, mais aussi l'Homme [575, 576]. Des études au Pérou ont montré que les microchiroptères pouvaient, comme les autres mammifères, être des réservoirs de *Leptospira* [575, 576] et l'étude de Matthias *et al.* [576] rapporte une prévalence du portage rénal de 3,4% (n=589) chez les microchiroptères. Cette prévalence diffère en fonction des espèces, mais l'étude montre que *Promops nasutus*, de la famille des Molossidés (comme *M. francoismoutoui*) peut être porteur de *Leptospira* [576]. Tulsiani *et al.* [577] ont démontré en Australie l'existence d'une transmission potentielle des leptospires à partir des chauves-souris frugivores (*Pteropus* sp.) vers les rongeurs, par contact des rongeurs avec les urines des chauves-souris excrétrices.

On peut supposer qu'il existe à La Réunion un cycle de transmission chauves-souris/rongeurs permettant le maintien de *Leptospira* dans les milieux où ces deux espèces cohabitent [576].

Par conséquent, à La Réunion, *M. francoismoutoui* peut être considéré comme un réservoir de maintien et une source de transmission de *Leptospira*.

Il nous est difficile d'évaluer le risque de transmission de la leptospirose liée à *M. francoismoutoui* du fait de la faible taille de l'échantillonnage et du peu de prélèvements analysables par PCR (présence d'inhibiteurs dans la majorité des prélèvements conduits). Néanmoins, même si la prévalence du portage rénal est faible, nous montrons que le risque de transmission existe et que *M. francoismoutoui* est probablement impliqué dans le maintien d'un cycle sylvatique, mais aussi rural et urbain car cette espèce, d'effectif important, occupe des habitats variés. De plus, on retrouve des colonies dans les écoles, les maisons, derrière des volets, les kiosques de pique-nique (*observation personnelle*)...ces gîtes, pouvant être proches de l'Homme représentent un risque zoonotique de transmission de la leptospirose.

A la grotte de Trois Bassins qui compte plusieurs milliers d'individus de *M. francoismoutoui* (Lydie Héré, communication personnelle), des personnes viennent prélever du guano pour l'utiliser en maraîchage. Il est difficile de dire si la manipulation du guano présente un risque de contamination par *Leptospira* pour ces personnes, néanmoins, le petit Molosse de La Réunion étant un excréteur potentiel de leptospires, il convient de prendre des précautions de base pour la manipulation de leurs excréments (port de gants, bottes et lunettes). Enfin, un des moyens de défense de ces animaux lorsqu'ils sont au sein de la colonie est d'uriner sur les intrus (observation personnelle) ce qui représente un moyen de contamination très important pour les chiroptérologues ou les personnes qui utilisent le guano, notamment par pénétration *via* la muqueuse oculaire.

Les personnes en contact avec les chiroptères doivent être informées du risque de contamination par *Leptospira*.

3.2. Charge bactérienne rénale

Nous avons montré :

- qu'il n'existait pas de différence significative entre les charges bactériennes rénales chez le chien, le chat, le cerf, la chèvre, le bovin, le porc, et la musaraigne ;
- que la comparaison avec la souris et le rat noir pouvait prêter à discussion car la dispersion des valeurs de charge autour de la moyenne implique des facteurs particuliers pour ces deux espèces ;
- qu'il existe d'une corrélation positive entre le poids et la charge bactérienne rénale chez les jeunes rats noirs naturellement infectés (cette corrélation n'a pas été mise en évidence chez la souris à cause du faible nombre d'individus dont nous disposions).

La qPCR est une méthode alternative à la quantification des leptospires dans les tissus par culture, coloration argentique ou immunofluorescence.

La dynamique de l'infection par *Leptospira* a été peu étudiée [287, 325, 491, 500, 578, 579, 580]. Toutes les expérimentations sur animaux utilisent la voie intra-péritonéale comme voie d'infection [287, 325, 491, 500, 579] exceptée l'étude de Lourdault *et al.* [578] qui teste aussi l'inoculation par voies conjonctivale et sous-cutanée. Les modèles d'inoculation par voie

intra-péritonéale ou sous-cutanée ne reflètent pas les conditions de pénétration de la bactérie lors d'infection naturelle où *Leptospira* pénètre par une brèche cutanée ou en traversant une muqueuse [9]. De plus, ces voies d'infection expérimentales induisent un biais en surestimant probablement la charge en pathogènes dans les tissus et en diminuant le temps de dissémination de la bactérie dans l'organisme [500].

Nos données de quantification de charge bactérienne rénale sont les premières rapportées sur des animaux infectés naturellement. Nous ne connaissons pas :

- l'antériorité de la contamination (alors que les modèles expérimentaux sont étudiés sur une durée courte, de 220 jours maximum [325]),
- la fréquence des réinfections,
- les possibilités de co-infection d'un animal par plusieurs souches de *Leptospira*,
- l'influence des facteurs individuels et environnementaux sur la charge bactérienne rénale.

Les expérimentations sur *R. norvegicus* rapportent l'absence de lésions histopathologiques au niveau des reins lors d'infection par *Leptospira* [287, 325, 491, 500]. L'inoculum minimal (par injection intra-péritonéale) permettant la colonisation rénale a été estimé à 10^4 leptospires [500] et la concentration des leptospires dans les urines est probablement très élevée puisque lors d'infection expérimentale, elle atteint 10^7 organismes/ml [287] ce qui laisse supposer qu'en milieu naturel l'exposition à de fortes concentrations de leptospires est fréquente. De plus, ces études de laboratoire montrent que la charge rénale maximale en leptospires est observée dans les reins à 4-6 jours post-inoculation chez les animaux, qu'ils soient sensibles comme le cochon d'Inde [578] ou résistants comme le rat surmulot [500]. Thiermann [325] a montré que, infecté par le sérovar Icterohaemorrhagiae *R. norvegicus* pouvait excréter des leptospires pendant au moins 220 jours, ce qui prouve que la durée de la colonisation rénale est au minimum égale à cette période chez le rat surmulot infecté par ce sérovar. L'observation par microscopie électronique à balayage de sections rénales collectées 28 jours post-infection chez *R. norvegicus* montre la très forte densité en leptospires dans la lumière des tubules rénaux (**Figure 30**).

Il existe des différences dans la capacité de colonisation des reins entre les souches de *Leptospira* [325]. Une adaptation souche-dépendante de l'hôte est aussi décrite [287],

suggérant que la charge rénale, la quantité de leptospires excrétés et la durée de portage varient en fonction de la souche contaminante.

Enfin, Nally *et al.* [287] rapportent que les jeunes rats surmulots infectés par le sérovar Copenhageni n'excrètent que pendant 72 jours ; ils émettent l'hypothèse que les variations dans la quantification des leptospires excrétés par voie urinaire sont liées à l'âge des animaux.

La charge bactérienne rénale varie donc en fonction :

- de l'antériorité de la contamination,
- de la dose infectante,
- de la souche infectante,
- de l'âge de l'animal infecté.

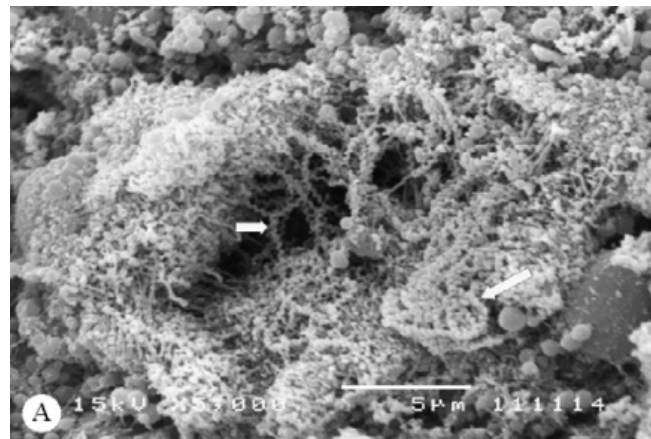


Figure 30 : Observation au microscope électronique à balayage d'une section de tissu rénal de *R. norvegicus* 28 jours après infection par 108 leptospires (grossissement x5000) [475].

La photographie présente la lumière d'un tubule rénal (centre de l'image) contenant une forte densité de leptospires présentant la morphologie spiralée typique. La petite flèche pointe un leptospire dans la lumière tubulaire. La grande flèche indique un leptospire attaché à la surface tubulaire interne, exposée à cause d'une rupture tissulaire. La zone autour des tubules rompus montre les surfaces tissulaires de l'hôte, sans leptospire visible, et présentant des corps sphériques, témoins de lésions non spécifiques des cellules adjacentes [500].

Pour expliquer l'hétérogénéité des résultats de quantification de charge bactérienne rénale chez les souris et les rats noirs, nous avons testé l'effet de l'âge et du poids sur la charge bactérienne. Nous avons mis en évidence que chez les jeunes la charge bactérienne rénale est positivement corrélée au poids. Compte-tenu des données bibliographiques d'infections expérimentales, notre observation nous conduit à l'hypothèse que, chez les animaux jeunes, en croissance, la charge rénale est dépendante du volume du rein et de la surface "colonisable". Chez l'adulte, en effet, on peut supposer qu'une taille maximale des reins est atteinte et avec elle la charge maximale en leptospires.

Hypothèse 1 : La charge rénale en leptospires est proportionnelle à la surface tissulaire colonisable.

Chez les jeunes, certains points sont en-dehors de la droite de régression. Chez les adultes, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le poids et la charge bactérienne rénale. Même en supposant que l'hypothèse 1 est vérifiée, (**Figure 29**), il apparaît que d'autres facteurs influencent cette charge, notamment l'antériorité de la contamination et la souche infectante.

Hypothèse 2 : La charge bactérienne rénale est proportionnelle à l'antériorité de la contamination.

Hypothèse 3 : La charge bactérienne rénale (et la durée de l'infection) est dépendante de la souche infectante.

Enfin, d'autres facteurs, tels que des facteurs individuels (par exemple un facteur génétique) peuvent influencer la résistance de l'animal à la colonisation par *Leptospira*.

3.3. Transmission de la leptospirose de l'animal à L'Homme à La Réunion

L'environnement tropical est favorable à la survie et au maintien des leptospires [13] et la densité d'hôtes réservoirs à La Réunion impliquent que les infections sont fréquentes, donc précoces chez les jeunes (pas de différence entre les adultes et les jeunes pour la séroprévalence et la prévalence du portage rénal). De plus, notre étude, conduite à cheval sur la saison des pluies et la saison sèche, n'a pas mis en évidence de différence significative entre l'est et l'ouest dans séroprévalence et la prévalence du portage rénal chez les micromammifères sauvages ou les carnivores errants. Par conséquent, l'incidence de la maladie est la même chez ces animaux quelques soit la zone de l'île et le taux de contamination du milieu par les animaux excréteurs est, en théorie, le même à l'est qu'à l'ouest de l'île.

Chez l'Homme, contrairement à ce que nous observons chez les micromammifères sauvages et les carnivores errants, la séroprévalence et l'incidence de la maladie sont supérieures à l'est de l'isohyète 2000 mm de pluie par an [75, 88, 201] (**Figure 20**). En milieu

tropical, l'Homme s'infecte principalement par voie indirecte [581]. La persistance et la transmission de la bactérie sont probablement plus avantageées à l'est qu'à l'ouest de l'île, car favorisées par l'abondance de la pluviométrie de cette région [156, 157, 193].

La séroprévalence et la prévalence du portage rénal chez les micromammifères sauvages et les carnivores errants ne semblent pas dépendre de la zone géographique, donc du climat, et se fait donc probablement préférentiellement par voie directe. Le climat pluvieux de l'est de La Réunion favorise le maintien de la bactérie dans l'environnement et par conséquent la transmission indirecte de la *Leptospira* à l'Homme.

La **Figure 31** et la **Figure 32** permettent de comparer les différents sérogroupes mis en évidence par MAT chez les animaux (toutes espèces confondues) et l'Homme (données sérologiques compilées, de 1998 à 2009, issues des Rapports du Centre National de Référence des Leptospiroses de l'Institut Pasteur de Paris). Le séro groupe Icterohaemorrhagiae est le séro groupe responsable de 59,3% des cas cliniques chez l'Homme à La Réunion ; chez les animaux, il représente 20,2% des sérogroupes retrouvés chez les animaux. Les rats (et probablement les souris et les musaraignes) sont les sources principales de l'infection humaine (directe et indirecte) par le séro groupe Icterohaemorrhagiae à La Réunion.

Le séro groupe Canicola est rapporté dans 12,1% des infections animales et c'est le deuxième séro groupe d'importance chez l'Homme (17,5% des infections humaines). Le réservoir principal de ce séro groupe semble être le chien, mais les rats jouent aussi très probablement le rôle de réservoir. Sejroe est responsable de 12,1% des infections chez les animaux et de 5,4% des infections chez les patients réunionnais. Ce séro groupe est principalement hébergé par l'espèce bovine qui en est le principal réservoir, mais les rats et le chien peuvent aussi servir d'hôtes.

Panama et Pyrogenes sont principalement retrouvés chez trois espèces d'animaux de rente : les caprins, les cerfs Rusa et les porcins ; ces deux sérogroupes sont responsables respectivement de 32,4% et 13,9% des infections chez les animaux. Chez l'Homme, ils ne comptent que pour 0,2% et 1,4% des infections. Il y a donc un déséquilibre entre la prévalence des sérogroupes Panama et Pyrogenes chez les animaux et chez les patients. Deux hypothèses peuvent expliquer ce déséquilibre : 1/ la fréquence de transmission à l'Homme de *Leptospira* par les caprins, porcins et cervidés est très faible ; 2/ les infections de l'Homme par les sérogroupes Panama et Pyrogenes induisent des formes asymptomatiques et ne sont pas diagnostiquées, comme cela est décrit au Cambodge et au Mexique [231, 565].

Les sérogroupes Cynopteri et Tarassovi sont retrouvés chez les animaux, chacun à hauteur de 1,7% des sérogroupes circulant identifiés par MAT. Cynopteri circule chez le rat noir et le porc, tandis que Tarassovi circule chez les chiens et les bovins. Chez l'Homme, ces deux sérogroupes représentent respectivement 0,7% et 5% des sérogroupes retrouvés lors de formes cliniques.

Quatre animaux (2,3%) ont été trouvés séropositifs pour les sérogroupes Mini et Ballum. Le séro groupe Ballum ne fait pas partie du panel d'antigènes utilisé pour le diagnostic des cas humains ; au contraire, Mini est utilisé en routine au laboratoire de diagnostic, mais la souche que nous avons utilisée pour la recherche d'anticorps chez les animaux était différente de celle utilisée en médecine humaine. *Mus musculus* est généralement réservoir du séro groupe Ballum [280, 494, 503, 582, 583] qui peut aussi être retrouvé chez les rats [494, 503, 583]. Nos résultats ne permettent pas d'affirmer que les sérogroupes Ballum et Mini circulent à La Réunion. Mais si tel était le cas, ces sérogroupes semblent avoir une importance mineure.

Les sérogroupes Autumnalis et Bataviae sont retrouvés chacun chez un animal et ne sont jamais diagnostiqués comme responsable de l'infection chez l'Homme. Les titres en anticorps retrouvés chez les animaux sont faibles (100) pour ces sérogroupes (**Tableau 15** et **Tableau 16**) et résultent probablement de réactions non spécifiques.

Aucun animal n'a été trouvé séropositif pour les sérogroupes Hebdomadis, Australis, Pomona, Wolfii et Grippytyphosa alors qu'ils semblent circuler chez l'Homme. Le séro groupe Wolfii (4,7% des réactions séropositives chez les patients) n'était pas inclus dans notre panel d'antigènes, néanmoins, chez les animaux ayant un résultat sérologique "non déterminé" (**Tableau 16**) des anticorps contre les sérogroupes Hebdomadis, Australis, Pomona et Grippytyphosa ont été retrouvés. Nous pensons que les agglutinations retrouvées chez les patients et les animaux contre ces sérogroupes minoritaires sont des réactions non spécifiques plutôt que le reflet d'infection par ces sérogroupes.

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur les réservoirs potentiels des sérogroupes mineurs sur l'île. En ce qui concerne les sérogroupes principaux circulant à La Réunion (*Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Sejroe*) nos résultats permettent d'identifier les espèces réservoirs, sources de contamination pour l'Homme.

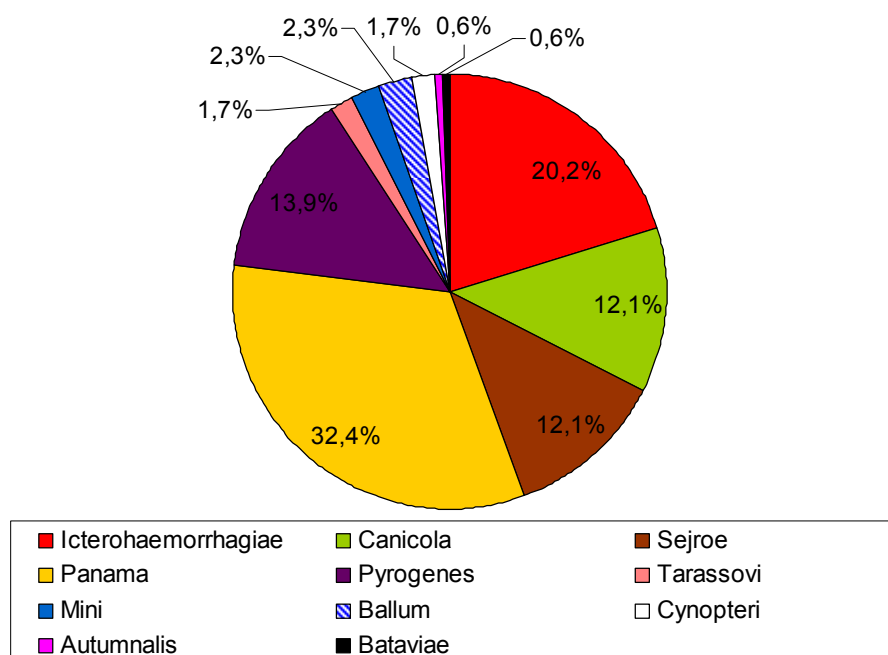


Figure 31 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 173 animaux séropositifs à La Réunion (prélèvements faits en 2009).

Le graphique représente les sérogroupes circulant chez l'ensemble des espèces étudiées par sérologie : rat noir, rat surmulot, tenrec, chat, chien, bovin, caprin, cerf Rusa, porc. Dans notre étude, 51 animaux étaient séropositifs pour plusieurs sérogroupes et ne sont pas représentés sur ce graphique.

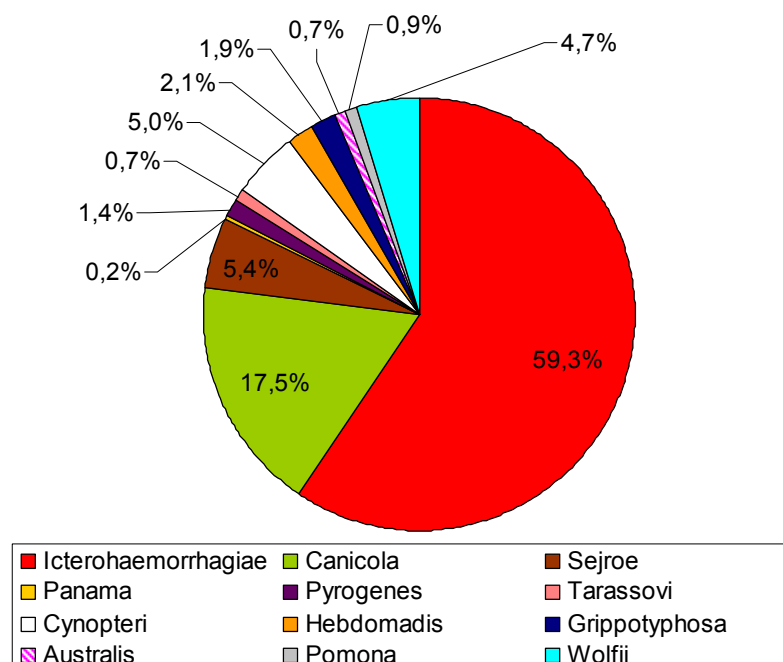


Figure 32 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 423 patients diagnostiqués à La Réunion entre 1998 et 2009 (données du CNRL).

Pour cette même période, 253 autres cas ont été diagnostiqués par PCR ou par MAT, avec des agglutinations pour plusieurs sérogroupes ne permettant pas de définir le séro groupe infectant.

A La Réunion, il existe un cycle de transmission rural (**Figure 33**), un cycle de transmission urbain (**Figure 35**) et un cycle sylvatique (**Figure 34**). Ces trois schémas épidémiologiques font intervenir des espèces différentes dont la contribution à la contamination environnementale (et donc à la contamination potentielle de l'Homme) varie en fonction de la densité de cette population dans ces différents écosystèmes, des souches impliquées, de la prévalence du portage rénal de *Leptospira* et de la charge bactérienne rénale retrouvée dans cette espèce.

A La Réunion, comme dans de nombreuses autres régions du monde, on observe une fragmentation des habitats naturels qui conduit à l'intrusion des hommes et de leurs espèces animales commensales (par exemple chevaux, bovins, chiens, chats, rats) dans des écosystèmes autrefois sauvages. Ces changements écologiques favorisent l'émergence des maladies infectieuses en mettant les humains en contact avec de nouveaux réservoirs ou agents infectieux. Les chauves-souris [584] et les rats [585] et autres micromammifères [586] répondent très bien aux modifications, à la perte, et à la fragmentation de leur habitat, leur dynamique spatiale et temporelle sont particulièrement sensibles aux changements d'activités anthropiques. Les conséquences de l'altération de la dynamique spatiale et temporelle sur l'écologie de la leptospirose et les probabilités de transmission à l'Homme sont peu connues. Néanmoins, les activités humaines dans des aires non perturbées au préalable peuvent augmenter directement ou indirectement le risque d'infection par de nouveau sérovars.

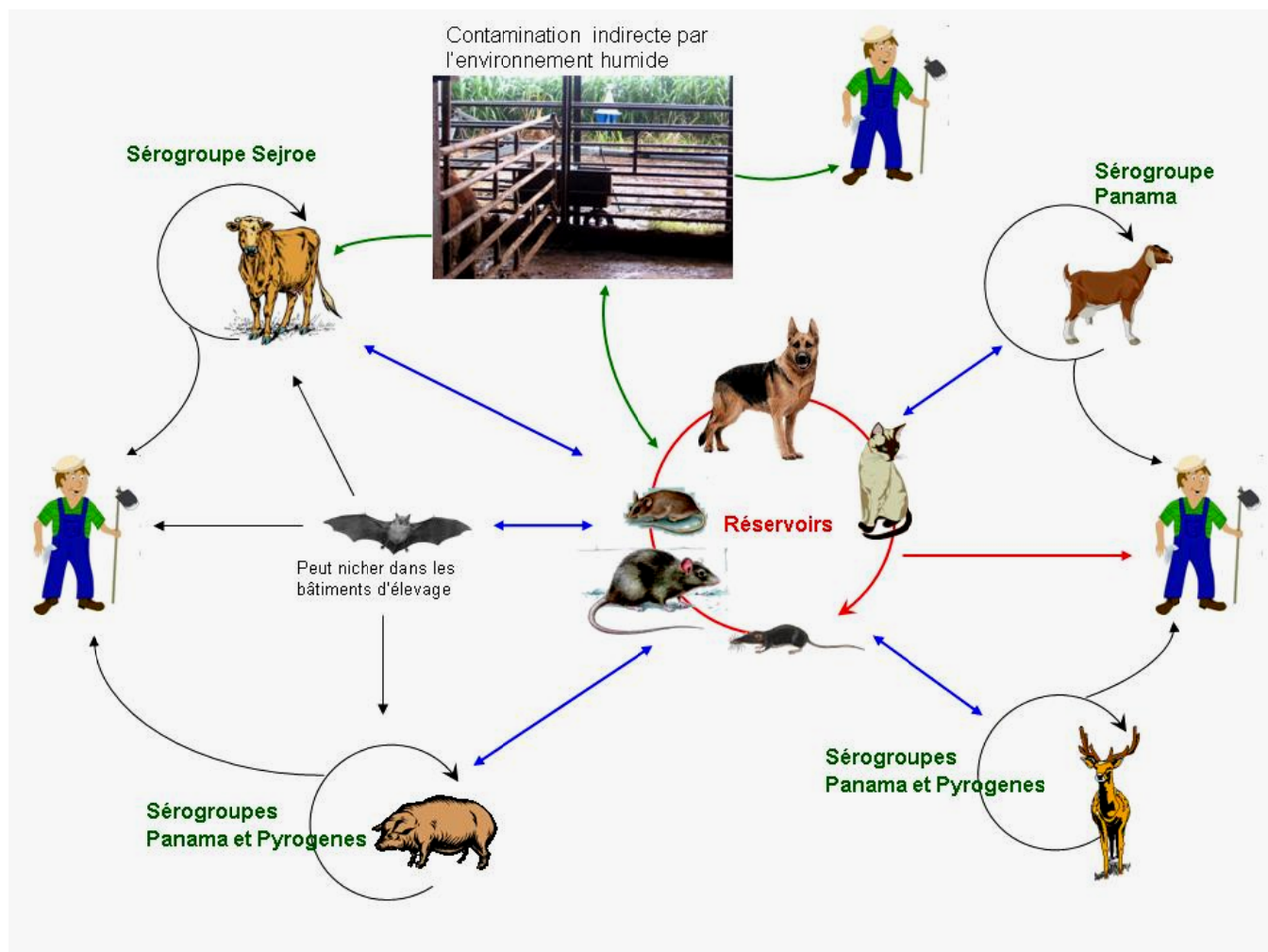


Figure 33 : Voies présumées de transmissions rurales de *Leptospira* à La Réunion.

**Le milieu forestier réunionnais :
réservoir de leptospires**



Eau stagnante



Traces de présence des rats
(choca, forêt de la Grande Chaloupe)



Chiens domestiques en promenade



Non excréteur

Icterohaemorrhagiae
Canicola
Autres sérogroupes ?

Rats : présents jusqu'à 3000m d'altitude

Randonneurs chasseurs



Figure 34 : Voies présumées de transmissions sylvatiques de *Leptospira* à La Réunion.

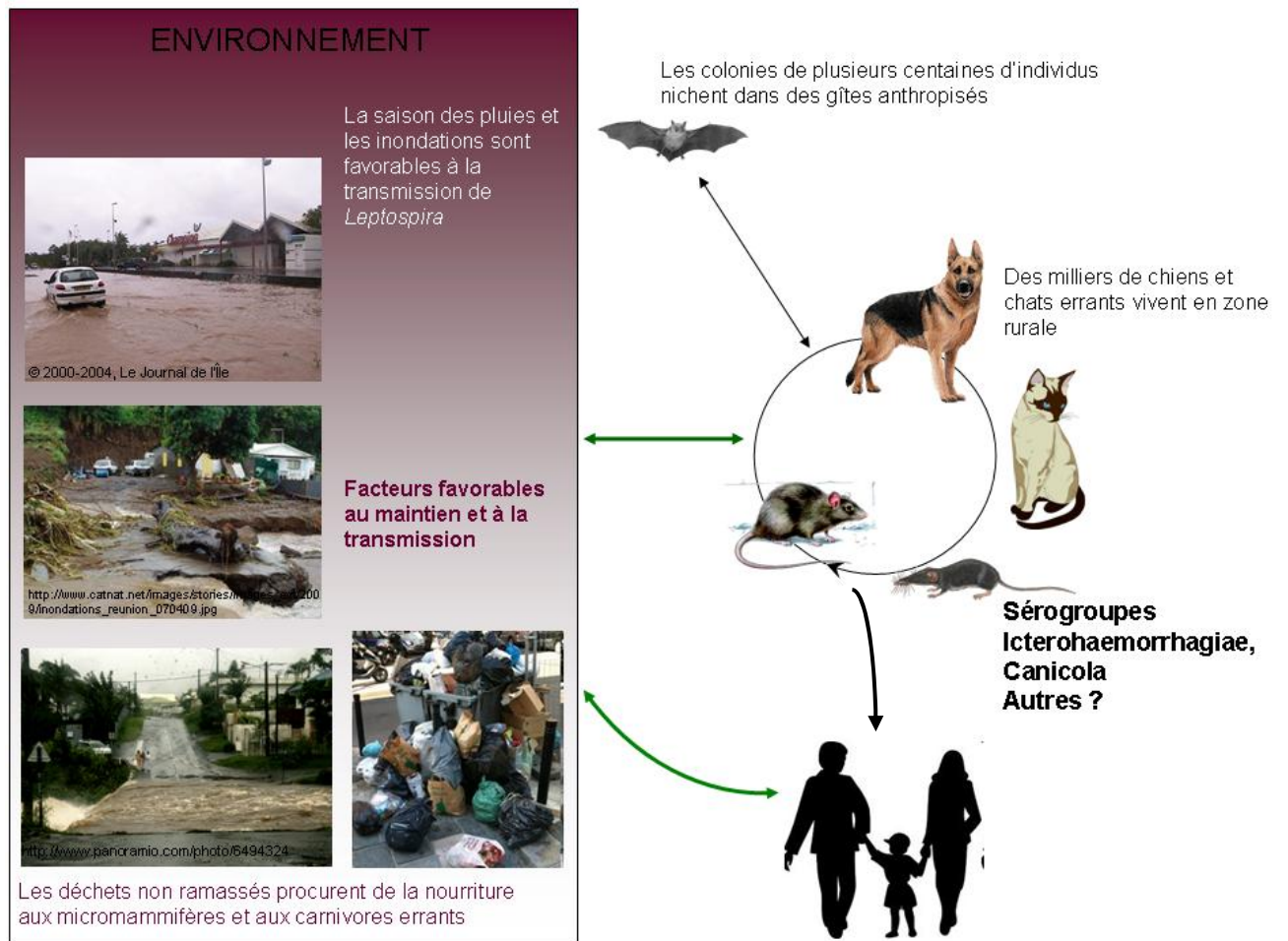


Figure 35 : Voies présumées de transmissions urbaines de *Leptospira* à La Réunion.

CHAPITRE VII

EPIDEMIOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE A MAYOTTE

1. Problématique

Le premier objectif de notre travail à Mayotte était de déterminer l'existence d'un lien entre les cas humains de leptospirose et un (ou plusieurs) animaux réservoir. Nous avons étudié pour la première fois à Mayotte la séroprévalence de la leptospirose chez quatre espèces animales commensales de l'Homme (rat noir, chien, lémur brun et roussette) par la méthode du MAT en utilisant comme antigènes des souches isolées localement chez des patients [74, 228]. De plus, nous avons recherché la présence d'ADN de leptospires pathogènes dans les reins de rats noirs par PCR quantitative en temps réel et avons comparé les séquences d'ADN des *Leptospira* présents chez ces rats avec celles des souches isolées chez les patients [74, 228].

Les données concernant le statut des animaux, réservoirs potentiels de la bactérie, sont un préalable essentiel à la mise en place de mesures de contrôle sanitaire efficace à Mayotte où la maladie, endémique, présente chez l'Homme une épidémiologie très particulière. Les données de biologie moléculaire apportent un éclairage nouveau sur l'épidémiologie de la maladie sur cette île tropicale.

2. Résultats

1.1. Bilan des captures

Au total, 292 échantillons d'animaux (156 rats noirs, 50 lémurs bruns, 49 roussettes, 29 chiens domestiques, et 8 chiens errants), prélevés entre le 29 mars et le 13 mai 2007²¹, ont été traités. Pour 31 rats noirs, nous n'avons pas pu obtenir de prélèvement sanguin. Le rat surmulot est absent de Mayotte.

Les sites de capture ont été cartographiés sur la **Figure 37**.

La **Figure 36** illustre le déroulement des captures de lémurs bruns et de roussettes.

Les informations relevées pour chaque animal sont résumées dans le **Tableau 39**.

²¹ Projet de recherche ChikAni (INRA).

Pour les chiens domestiques, les motifs de consultation chez le vétérinaire sont résumés dans le **Tableau 42**. Pour les chiens domestiques, la moyenne d'âge des animaux échantillonnés était de 4 ans. Nous n'avons pas l'âge exact pour les autres espèces, mais seulement une estimation "adulte" ou "jeune".



Figure 36 : Capture et prélèvements sur lémurs bruns et roussettes à Mayotte (ChikAni, 2007).

Tableau 41 : Animaux prélevés à Mayotte en 2007.

Espèce	Nb total capturés	Nb femelles	Nb mâles	Sexe nd	Adultes	Juvéniles	Age nd	Poids moyen (±écart-type)	Poids min-max	Longueur corps (±écart-type)	Long. corps min-max (mm)	Lieu de capture (animaux sauvages) / Lieu de résidence (chiens domestiques)
Roussette	49	31	18	0	30	18	1	372,9 ± 116,8 g	161,0 - 629,0 g	na	na	Coconi (45), Saziley (4)
Lémur brun	50	25	25	0	41	8	1	1935,2 ± 399,9 g	950 - 2750 g	na	na	Coconi (28), Dzoumogne (5), Jimaweni (8), Mtsangamouji (2), Sada (1), Saziley (6)
Chien	37	12	15	10	34	3	8	na	na	na	na	Kangani (1), Boueni (3), Chiconi (1), Combani (1), Dembeni (1), Dzaoudzi (2), Dzoumogne (1), Iloni (1), Kangani (1), Koungou (3), Labattoir (5), Mamoudzou (6)
Rat noir	156	87	68	1	92	64	0	112,65 ± 36,46 g	25,0 - 216,0 g	170,0 ± 21,76 mm	99,0 - 210,0 mm	Bandraboua (16), Coconi (37), Bambo Est (46), M'Tsangamouji (22), Mamoudzou (1), Sada (1), Saziley (33)

Tableau 42 : Motif de la consultation vétérinaire pour les chiens domestiques échantillonnés (données fournies par les vétérinaires).

Motif de la consultation	Nombre de chiens domestiques
Adoption	2
Anorexie	1
Certificat de bonne santé	5
Serologie brucellose	3
Sterilisation	3
Sterilisation et vaccination	2
Dermatite suppurée	1
Tatouage et sterilisation	2
Vaccination	7
Pas d'information	3
Total	29

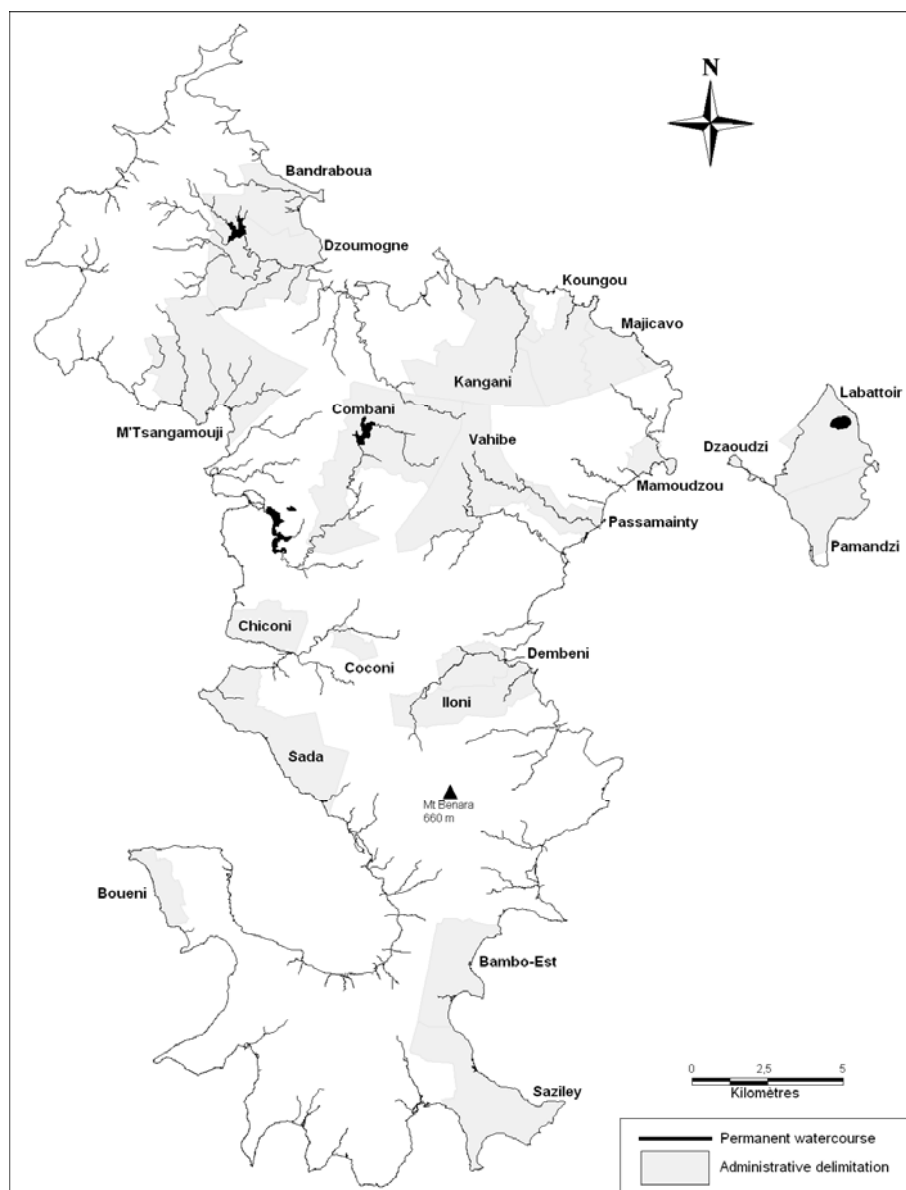


Figure 37 : Cartographie de Mayotte présentant les lieux de capture des animaux (Carte S. Girard, ADEM-GESAM/CIRAD).

1.3. Publication des résultats majeurs

Article 5 : Leptospirosis among four animal species in Mayotte (Indian Ocean) and link with human cases.

1.2. Résultats

L'**Annexe J** présente les tableaux des résultats de sérologie par espèce, et de qPCR sur tissu rénal pour les rats noirs. Pour chaque espèce les résultats sont détaillés en fonction du sexe, de l'âge et, pour les chiens, du type d'animal (domestique ou errant) et du statut vaccinal.

Les résultats de séroprévalence sont résumés dans le **Tableau 43**.

Tableau 43 : Séroprévalence de la leptospirose chez les animaux étudiés à Mayotte et intervalle de confiance à 95% (IC95%).

	N	N positifs	Séroprévalence (%)	IC95% de la séroprévalence
Rats noirs	125	14	11,2	5,7 – 16,7
Lémurs bruns	50	1	2	1,8 – 5,9
Roussettes	49	5	10,20408	1,7 – 18,7
Chiens domestiques	29	27	93,10345	83,9 – 102,3
Chiens errants	8	7	87,5	64,6 – 110,4

Le **Tableau 44** présente les résultats bruts du MAT pour chaque espèce ou catégorie (vacciné/non vacciné, domestique/errant) d'animaux, tandis que la **Figure 38** présente ces mêmes résultats par séro groupe.

Tableau 44 : Résultats bruts du MAT pour les animaux de Mayotte.

Le tableau présente les résultats de séropositivité significative pour chaque souche testée et les titres observés (minimum-maximum), sans tenir compte des réactions de co-agglutination.

	Rats noirs	Roussettes	Lémurs	Chiens dom. vaccinés	Chiens dom. non vaccinés	Chiens errants
200701203 (Mini)	8 (100-400)			3 (400-1600)	1 (200)	4 (200-3200)
200803703 (Mini)	5 (100-400)			1 (1600)	1 (800)	1 (6400)
200901118 (Pomona)				1 (1600)		
201001127 (Pyrogenes)	2 (100-400)					1 (400)
200901122 (Pyrogenes)	1 (200)					1 (200)
201001125 (Pyrogenes)	2 (200, 400)		1 (400)			
200901489 (Pyrogenes)		4 (200-400)	1 (200)		1 (100)	1 (200)
Icterohaemorrhagiae				19 (100-12800)	2 (100, 800)	
Canicola				7 (100-800)	3 (100)	2 (100)
201001128 (Grippotyphosa)	1 (100)	1 (200)		1 (1600)		
200801774 (Grippotyphosa)	4 (100-1600)			1 (3200)		

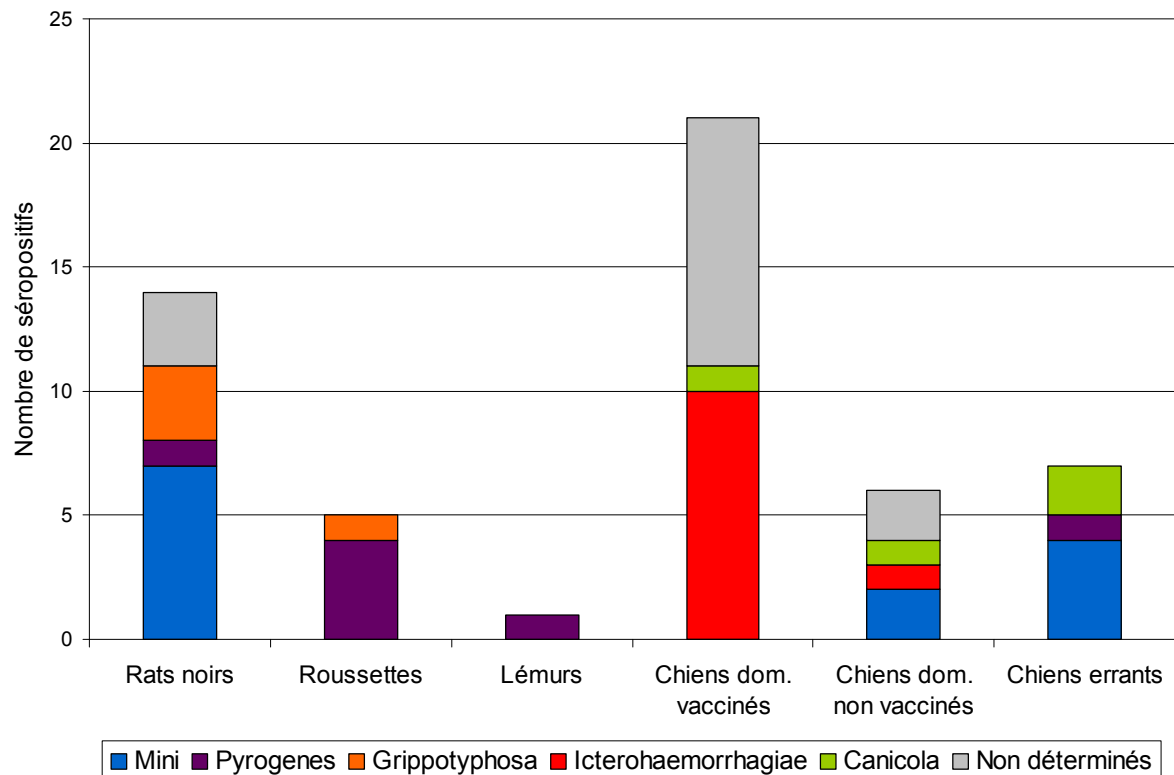
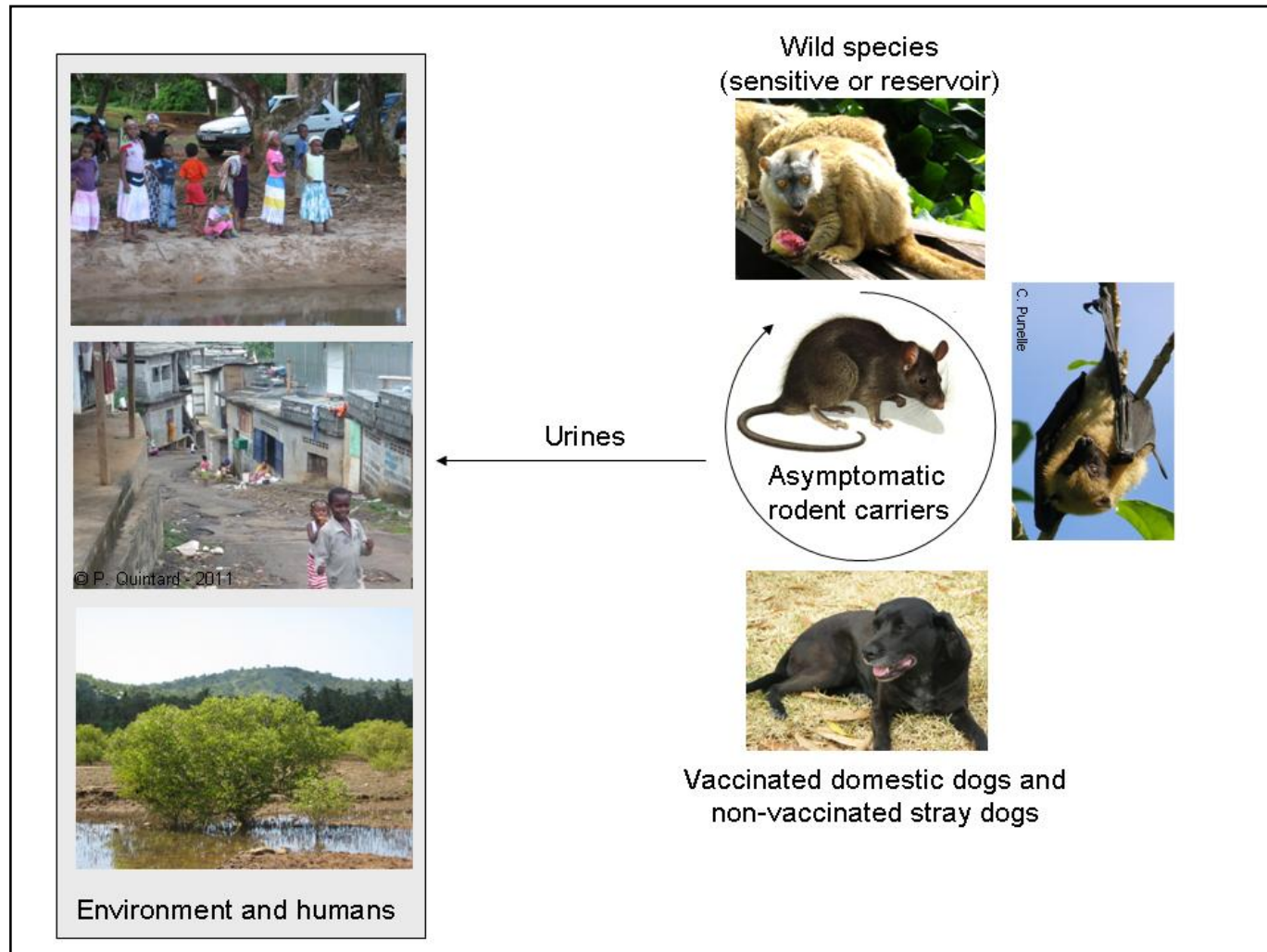


Figure 38 : Proportion des différents sérogroupes par espèce et catégorie chez les animaux étudiés à Mayotte.

L'alignement des séquences de l'ARNr 16S des *Leptospira* identifiés chez *R. rattus* montre un fort pourcentage d'homologie avec les séquences des souches de *Leptospira* isolées chez les patients mahorais (**Annexe L**).

Arbre phylogénétique

3. Epidémiologie et écologie de la leptospirose à Mayotte



CHAPITRE VIII

DISCUSSION GENERALE

1. Discussion sur la méthodologie

1.1. Quelle(s) méthode(s) d'investigation ?

Dans notre étude, nous avons employé quatre techniques de recherche de la présence d'une infection (récente ou ancienne) par *Leptospira* chez les mammifères :

- La sérologie par MAT,
- La qPCR sur reins,
- La qPCR sur urines,
- La culture de tissu rénal.

1.1.1. Test de microagglutination (MAT)

Le MAT est le test de référence sérologique pour la détection des anticorps anti-*Leptospira* sanguins et pour montrer une séroconversion chez des patients grâce à des sérums prélevés en phase aigüe et en phase de convalescence [13, 597]. Le MAT est "spécifique" de séro groupe [13]. Il est communément admis que le séro groupe pour lequel on observe le plus fort titre d'anticorps lors du MAT est considéré comme le séro groupe infectant. Or les réactions croisées entre séro groupes sont fréquentes et il existe de nombreux exemples de réactions paradoxales dans lesquelles des anticorps hétérologues, dirigés contre d'autres séro groupes que le séro groupe infectant, apparaissent pendant la phase initiale de la réponse immunitaire [13, 323]. Des études ont montré que la prédiction du sérovar infectant ne se révélait exacte que dans 50% des cas [323]. D'après Levett [323] la sensibilité du MAT pour la prédiction du séro groupe infectant (définie comme la proportion d'isolats identifiés par culture dont le séro groupe correspond au séro groupe prédominant identifié en sérologie) est d'environ 45%, tandis que sa spécificité (définie comme la proportion de patients avec un séro groupe prédominant sérologiquement et dont l'isolat appartient au sérovar correspondant) est d'environ 65%. Le risque d'erreur d'identification du séro groupe par sérologie est plus élevé lorsque le prélèvement sanguin est effectué en phase aigüe ou en début de convalescence [323, 597]. De plus, pour le diagnostic, le nombre de souches dépasse rarement vingt et ces souches correspondent à celles identifiées ou escomptées être présentes dans la population. Si une souche inconnue dans cette région (car jamais identifiée) circule dans la population, elle ne sera pas détectée [323].

Néanmoins, si on considère les résultats du MAT au sein d'une population (et non pour un individu isolé), ceux-ci permettent d'avoir une idée globale des sérogroupes circulant à l'échelle de la population [323].

Le MAT est une technique "observateur-dépendante", c'est-à-dire que son résultat peut varier en fonction du manipulateur [13] et, pour un même échantillon, une différence d'une dilution entre deux résultats obtenus pour deux observateurs n'est pas significative.

Enfin, en aucun cas le MAT ne permet de dater une infection puisque la durée de vie des anticorps et leur cinétique de diminution sont très variables en fonction des individus [598, 599, 600]. De plus, les recontaminations stimulent l'augmentation des titres des anticorps sériques dirigés contre la souche infectante, mais, aussi, par réaction croisée, contre d'autres sérogroupes responsables d'infections antérieures ou vaccinaux (réactions paradoxales) [323]. L'analyse sérologique de sérums appariés permet de discriminer une infection courante d'une infection passée. Mais un tel protocole n'est pas envisageable chez des animaux sauvages.

On sait aussi que les réactions paradoxales sont observées chez les chiens et que des vaccinations antérieures peuvent influencer la réactivité du sérovar [601].

La détermination d'un seuil de positivité (1:100 dans notre étude) est aussi cruciale dans les études de séroprévalence. Mais le choix est toujours discutable. En prenant un seuil de 1:100, qui est le seuil le plus utilisé dans les études épidémiologiques animales ou humaines, nous avons voulu rechercher tous les animaux ayant été en contact avec *Leptospira*. D'autres études ont choisi de prendre un seuil de positivité inférieur ou égal à 1:100 [313, 340, 359, 602, 603, 604, 605] ou plus élevé [262, 312], allant même jusqu'à 1:1600 [141] permettant ainsi la détection des animaux infectés récemment.

1.1.2. Amorces utilisées pour la qPCR

Nous avons choisi d'utiliser des séquences d'amorces (LipL32-45F/LipL32-286R) et une sonde d'hydrolyse (LipL32-189P) déjà publiées [150]. Ces amorces montrent une bonne sensibilité [150, 462] et une spécificité de 100% pour les *Leptospira* pathogènes [150]. La sensibilité de détection de la technique, évaluée au laboratoire sur le Rotor Gene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France) était de 7400 copies par ml (**Article 4**). Etant donné que *Leptospira*

contient en moyenne cinq genomes equivalents par bactérie [462], notre sensibilité analytique était de 1-2 bactérie(s) par µl, soit 2-2,5 bactéries par réaction.

Il est probable que la prévalence du portage rénal estimée chez les rats noirs de Mayotte soit sous-estimée dans notre étude (**Article 5**). En 2011, Bourhy *et al.* [462] ont montré la présence de deux mésappariements dans la séquence de l'amorce anti-sens LipL32-286R et deux autres dans la séquence de la sonde Taqman LipL32-189P (**Figure 39**) publiées par Stoddard *et al.* [150] qui empêchent l'amplification optimale et la quantification en qPCR des isolats de Mayotte avec ces amorces (cette publication est parue après que nous ayons terminé l'analyse par qPCR des échantillons de reins de rats noirs de Mayotte).

```

                                LipL32-45F
FioL1-130   1  AAGCATTACCGCTTGTGGTGGTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCAGGGACAAACGA
Lborg1929  1  AAGCATTACCGCTTGTGGTGGTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAGTTCAGGAACAAACGA

FioL1-130   91  AACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACCGGTTTAGTCGATGG
Lborg1929  91  AACTGTAAAAACATTCTTCCTTACGGAACAGTAATCAACTACTATGTTTACATCAAGCCAGGACAAGCGCCGACCGGTTTGGTCGATGG

FioL1-130   181  AAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCTGCGGTAATCGCTGAAATGGGAGTTC
Lborg1929  181  AAGCAAAAAAGCATACTACCTCTACGTTTGGGTACCTGCCGTTATCGCTGAAATGGGAGTTC
                                LipL32-286R

```

Figure 39 : Séquences nucléotidiques du gène *lipL32* de *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130 (FioL1-130) et *L. borgpetersenii* souche 200801929 (Lborg1929) [462].

Les séquences des amorces et de la sonde sont représentées sur fond noir (la séquence d'ADN de la souche Fiocruz L1-130 sert de référence pour les séquences publiées des amorces et de la sonde). Les nucléotides ayant un fond blanc au sein des séquences sur fond noir indiquent les positions de mésappariements (d'après [462]).

1.1.3. Comparaison des techniques

Au cours d'une étude épidémiologique en Australie en 2007-2008, Tulsiani *et al.* [577] ont collecté des échantillons à partir de chauves-souris frugivores (*Pteropus conspicillatus*) et de rongeurs afin de connaître le rôle potentiel des chauves-souris dans la transmission de la leptospirose aux rongeurs et de lister les leptospires pathogènes présentes chez ces animaux. Les prélèvements comprenaient des sérums, des échantillons de tissu rénal et des urines, et les méthodes de détection employées ont été la culture, le MAT, la PCR en temps réel et la coloration argentique de frottis. Les résultats de cette étude ont été analysés afin de rechercher quelle était la meilleure méthode de détection des leptospires dans les échantillons biologiques :

- Peu de cultures se sont révélées positives alors que de nombreux rongeurs se sont révélés porteurs de *Leptospira* par les autres méthodes de détection, probablement à cause des contaminations de nombreuses cultures ;
- Les résultats de sensibilité et de spécificité pour les différents tests diagnostiques indiquent que l'isolement de *Leptospira* par culture est très peu sensible comparé aux résultats de la PCR, mais que sa spécificité est élevée. Par ailleurs, le faible taux de réussite des cultures à partir de prélèvements est constaté dans de nombreuses études [496, 506, 576] ;
- La prévalence du portage rénal estimée par la méthode PCR sur tissu rénal et urine est supérieure à celle estimée par la culture, sans toutefois que des questions de spécificité n'aient pu être mises en cause.

La sérologie permet d'identifier les animaux qui ont été en contact avec la bactérie et pour lesquels des anticorps agglutinants circulent encore, mais elle ne permet pas de connaître leur rôle épidémiologique dans la transmission de la maladie. Par ailleurs, la présence de leptospires au niveau sanguin témoigne d'une infection récente mais pas du statut de réservoir. Le statut d'animal réservoir ne peut être affirmé sans la démonstration du portage rénal et de l'excrétion. Par ailleurs, la détection de *Leptospira* dans les urines, par culture ou par PCR, ne peut être la seule méthode d'investigation utilisée dans une étude épidémiologique car l'excrétion des leptospires par les hôtes réservoirs est intermittente. C'est pourquoi, la recherche de leptospires doit être conduite sur tissu rénal en priorité, spécifiquement dans la région corticale ou subcorticale [86]. Il est aussi possible d'investiguer la transmission verticale par recherche de la bactérie sur les tissus fœtaux [86].

L'isolement d'une souche locale est essentiel pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la leptospirose à une échelle locale [13, 135]. La culture est également le meilleur moyen d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour l'étude génétique des isolats, mais permet aussi la caractérisation sérologique précise de l'isolat, voire son utilisation dans un panel local de MAT.

Notre expérience de terrain et de laboratoire nous montre que cette technique est très difficile, coûteuse, et qu'elle demande un investissement considérable en temps.

Compte-tenu de sa sensibilité, permettant la détection de l'ADN de *Leptospira* dans des échantillons biologiques de petite taille, et de sa spécificité, pouvant être optimisée par l'utilisation de sondes, la PCR en temps réel s'est imposée comme la technique de choix pour la recherche de réservoirs animaux de *Leptospira*. De plus, la PCR est une technique robuste, peu affectée par les contaminants. Le prélèvement de choix est un échantillon de tissu rénal prélevé au niveau cortical, mais pour les espèces protégées, comme *Mormopterus francoismoutoui* dans notre étude, une investigation de l'excrétion urinaire est la méthode à privilégier.

1.1.4. Amélioration de la technique de culture

La recherche des réservoirs sauvages animaux se fait sur le terrain, dans des conditions parfois précaires. La contamination ou la dégradation des échantillons sont fréquentes et les problèmes liés au transport sont importants à considérer. Idéalement, la mise en culture doit se faire dans les 15 minutes suivant la mort de l'animal, avant l'autolyse post-mortem qui permet aux micro-organismes de migrer entre les fluides et les tissus [606]. Au sein du milieu de culture, riche en nutriments, les spores fongiques et les bactéries entrent en compétition avec les leptospires [9]. De plus, même en cas de réussite de l'isolement, la culture *in vitro* de *Leptospira* est très exigeante du point de vue des conditions de température et de pH [9]. L'ensemble de ces facteurs rend l'isolement des leptospires sur le terrain très difficile [326, 582, 607].

L'utilisation d'inhibiteurs de contamination (5-Fluoro-Uracile, Rifampicine) permet de s'affranchir partiellement du problème des contaminations et s'est révélée très efficace dans différentes études pour augmenter la sensibilité de la culture [496, 576, 582]. Par ailleurs, notre travail montre qu'il serait possible de cibler les reins à mettre en culture en choisissant préférentiellement les animaux ayant une protéinurie (résultat obtenu très rapidement sur le terrain grâce à l'analyse par bandelette urinaire), puisque ces animaux ont plus de chance d'être porteurs au niveau rénal.

Cette sélection, combinée à l'utilisation d'antibiotiques comme inhibiteurs de contamination, pourrait augmenter la sensibilité de la méthode de culture et conduire ainsi à l'isolement de souches de leptospires depuis les animaux réservoirs à La Réunion.

1.2. Utilisation des séro-buvards

Dans notre étude de la séroprévalence de la leptospirose dans la population réunionnaise [423], nous avons employé la technique de sérologie sur buvards. Il était initialement prévu de mettre en œuvre cette technique sur les prélèvements sanguins sur buvard effectués sur les musaraignes, souris et chauves-souris, mais cela n'a pu être fait au cours de la thèse.

La sérologie sur buvard est une technique présentant plusieurs avantages :

- Facilité de prélèvement [423, 608, 609, 610],
- Facilité de transport [423, 608, 609],
- Les buvards sont légers et ne peuvent se casser [609],
- Facilité de conservation [423, 608, 609],
- Nécessite peu d'espace pour le stockage [609, 610],
- Utilisable pour des enquêtes à grande échelle [423],
- Utilisable en pays en voie de développement (ne nécessite pas de respect de la chaîne du froid, conservation à température ambiante [609]...),
- Prélèvement peu invasif [423],
- Coût peu élevé [609, 610],
- Possibilité d'envoi par voie postale [609].

Néanmoins, cette technique présente quelques inconvénients :

- Différence d'une à deux dilutions entre la méthode sur buvard et la sérologie sur sérum fluide [608, 609],
- Légère gêne à la lecture du MAT à cause des fibres de buvard non broyées encore présentes,
- Nécessité d'utiliser des buvards certifiés pour le prélèvement sanguin [609],
- Contamination possible par contact entre les buvards s'il y a contact entre des buvards non secs [611],
- Difficulté d'élution des anticorps, qui est dépendante du tampon d'élution utilisé [611],
- Diminution de la réactivité des anticorps au cours du stockage si les conditions de ce stockage ne sont pas optimales [610].

Les taux d'incidence et le nombre de cas déclarés par an ne montrent qu'une partie du nombre total de personnes contaminées par *Leptospira* chaque année, puisque les formes asymptomatiques ou paucisymptomatiques, bien que les plus nombreuses [13], ne sont ni diagnostiquées ni déclarées.

Grâce à ses nombreux avantages, la méthode des séro-buvards permet les études à grande échelle. L'étude conduite au GHSR sur 2269 séro-buvards a permis de montrer une diminution de la séroprévalence à La Réunion sur une période de 20 années. Cette étude a aussi permis de montrer que le nombre de cas déclarés chaque année est très inférieur au nombre réel de personnes contaminées. En effet, nous avons estimé à $800\,000 \times 0,66\%$ soit 5280 le nombre de personnes ayant été infectées par *Leptospira* et présentes sur l'île en 2006. Bien que la durée de vie des anticorps à un taux élevé puisse être de plusieurs années et soit très variable en fonction des individus [598, 600, 612], ce chiffre n'est pas compatible avec la moyenne annuelle du nombre de cas déclarés (56 cas en moyenne par an entre 1998 et 2009, données du Centre National de Référence sur les *Leptospires*).

Ainsi, nous montrons l'importance du nombre de personnes contaminées chaque année et pour lesquelles le diagnostic de leptospirose n'est pas établi. Ces formes bénignes, asymptomatiques, paucisymptomatiques voire grippales, représentent la majorité des cas à La Réunion, les formes graves ne sont que la partie "émergée de l'iceberg".

Enfin, la méthode des séro-buvards pourrait être utilisée pour des suivis de séroprévalence et de mesure de l'incidence au sein de la population, grâce à un suivi de la séroprévalence au cours de l'année. Il est en effet envisageable de prélever une cohorte par simple piqure du doigt avant la saison des pluies et après celle-ci, afin de voir le taux de séroconversion au sein de la population.

1.3. Méthode de quantification de la charge bactérienne rénale

Pour la quantification de la charge bactérienne rénale, nous avons utilisé une courbe standard externe et nous avons inclus dans chaque run un échantillon standard de concentration connue quantifié au préalable avec le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, Paisley, Royaume-Uni). Notre méthode de quantification de la charge bactérienne rénale implique que le rendement d'extraction est considéré égal à 100%. Ce préalable, bien que théorique et non réalisable dans les faits, était la condition à poser afin de pouvoir

comparer les charges bactériennes rénales entre les différents échantillons. Ce préalable ayant été posé pour tous les échantillons, nous considérons que la comparaison inter-échantillon est objective et correcte, par contre, il est clair que la quantification en elle-même est probablement sous-estimée puisque nous n'avons pas extrait la quantité totale d'ADN du tissu rénal, et par ailleurs, lors du stockage des échantillons, cette quantité diminue [613].

De plus, la détection du génome par PCR est dépendante non seulement de la procédure d'amplification, mais aussi de la quantité et de la qualité de l'ADN génomique inclus dans la réaction. Le choix de la méthode de prélèvement, la taille de l'échantillon et le type de matériel affectent la qualité et la quantité d'ADN extrait à partir d'un échantillon [613]. Un seul opérateur a procédé à la totalité des prélèvements et des extractions, ce qui limite grandement les variations dues à l'échantillonnage et celles dues au processus d'extraction. Par ailleurs, chaque échantillon de tissu rénal a été pesé et, en moyenne, les 557 échantillons de tissus rénaux extraits pesaient $23,2 \pm 1,4$ mg. Les recommandations du fabricant du kit d'extraction étaient d'utiliser 20-25 mg de tissu rénal par extraction, ce qui a par conséquent été respecté, avec un intervalle de variation faible.

Il n'existe pas de méthode standard pour le prélèvement, la détection et la quantification de *Leptospira* dans les échantillons tissulaires. Il existe néanmoins de nombreuses méthodes de quantification de l'ADN, mais toutes ont leurs limites d'utilisation et d'applications [613].

Le rendement de la qPCR est dépendant de la qualité, de la pureté, et de la quantité d'ADN dans l'échantillon, notamment de la présence d'inhibiteurs. L'objectif de l'extraction est d'isoler un ADN intègre, pur, et en quantité suffisante pour une détection optimale de l'ADN par qPCR. Une fois que l'ADN a été extrait, le taux de dégradation de l'ADN varie significativement et est dépendant notamment du type d'échantillon et du protocole d'extraction, notamment de la composition du tampon d'élution [613]. Nous n'avons pas quantifié le taux de dégradation de l'ADN stocké. Néanmoins, les extractions ont été regroupées sur une période de temps la plus courte possible et les qPCR ont été conduites à la suite des extractions, dans l'ordre d'extraction, ce qui implique que le temps de conservation des échantillons extraits a été similaire pour la totalité des échantillons, limitant ainsi les variations inter-échantillons du taux de dégradation de l'ADN.

2. Hypothèses sur les origines et la diversité des leptospires à La Réunion et à Mayotte par l'histoire du peuplement par les mammifères

Dans ce chapitre, nous limiterons notre propos aux mammifères, qui sont les principaux hôtes des leptospires. Toutes les informations historiques proviennent de l'ouvrage d'Anthony Cheke et Julian Hume "*Lost Land of the Dodo*" [614] et de l'article d'A. Cheke "*The timing of arrival of humans and their commensal animals on Western Indian Ocean oceanic islands*" [430]. Les compléments d'informations ont été obtenus directement auprès de l'auteur.

2.1. Colonisation de La Réunion et Mayotte par les mammifères

La Réunion était totalement inhabitée avant d'être découverte par des navires européens en route vers les Indes vers 1500. Au début du XVII^e siècle, l'île était une escale sur la route des Indes pour les bateaux anglais et néerlandais. Les Français y débarquèrent pour en prendre possession en 1642 et la baptisèrent île Bourbon. C'est en 1665 qu'arrivèrent les vingt premiers colons de l'île Bourbon.

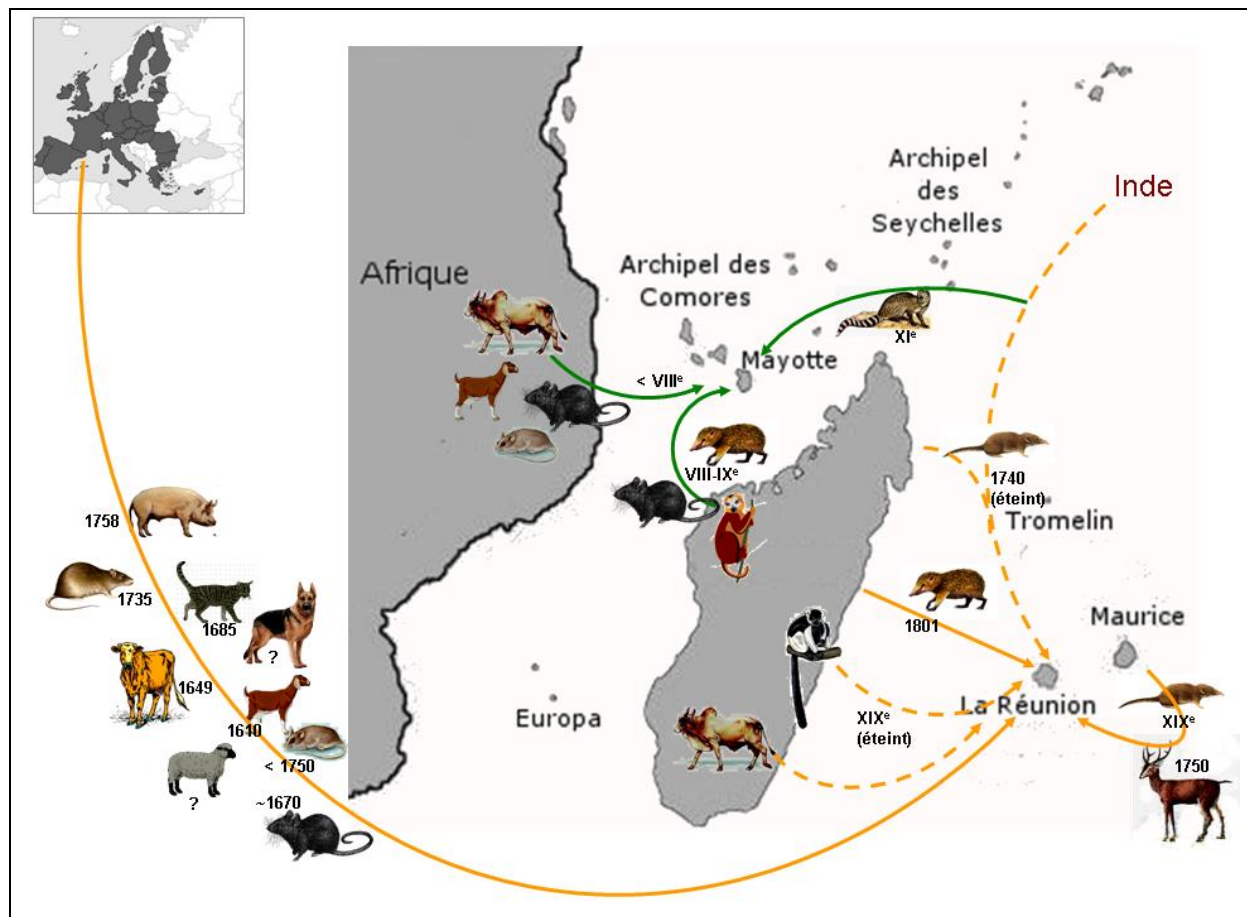
Les animaux domestiques arrivèrent par bateaux depuis l'Europe. Les anglais y amenèrent des chèvres et des cochons en 1629, les français y débarquèrent des bovins en 1949. Initialement, aucun rat n'était présent sur l'île de La Réunion, le rat noir arriva avec les bateaux européens au milieu des années 1670, suivi du chat en 1685, introduit par les colons pour lutter contre le rat. Le rat surmulot fut introduit depuis l'Europe en 1735, tandis que la souris domestique fut décrite pour la première fois en 1754 (mais elle devait avoir été introduite bien avant). La musaraigne fut introduite une première fois depuis l'Inde ou Madagascar vers 1740 mais cette population s'est éteinte, elle fut ensuite re-introduite à La Réunion depuis Maurice, au XIX^e siècle, tandis que le cerf *Rusa* fut importé comme gibier depuis Maurice pour la première fois en 1750 (population éteinte, puis ré-introduite de nombreuses fois par la suite, toujours depuis Maurice). Les colons introduisirent un autre gibier, depuis Madagascar, le tangué, en 1801. Des lémuriens (*Varecia variegata*) furent importés à La Réunion depuis Madagascar comme animaux domestiques, mais des individus échappés ont constitué une petite population vers 1820 qui s'est maintenue jusque vers 1870

(Figure 40). On sait par ailleurs qu'une petite population de zébus fut introduite sur l'île depuis Madagascar (*Anthony Cheke, communication personnelle*).

La colonisation de Mayotte par les hommes est beaucoup plus ancienne que celle de La Réunion puisque des traces de civilisation datant du VIII^e siècle ont été décrites sur cette île. Les premiers habitants des Comores (et de Mayotte) étaient des africains. Ces premiers habitants possédaient des chèvres (originaires d'Afrique), des poules, des chats (dont l'origine est inconnue) et les tenrecs *Tenrec ecaudatus* et les lémurins *Eulemur fulvus* étaient aussi présents à cette époque, importés depuis Madagascar pour la chasse. Le rat noir *R. rattus* était déjà présent au VIII^e siècle, introduit depuis l'Afrique et/ou Madagascar, tandis que le rat surmulot *R. norvegicus* n'est à ce jour décrit sur aucune des îles des Comores. Le mouton est décrit pour la première fois à Mayotte vers le XI-XII^e siècle. La présence du cochon sauvage à Mayotte *Sus scrofa* est récente (>1840). La petite civette indienne (*Viverricula indica*) fut introduite à Mayotte depuis l'Inde pour le commerce des sécrétions de leurs glandes périnéales, utilisées notamment en médecine traditionnelle. L'introduction de la civette date probablement du XI^e siècle, mais sa première description fut faite vers 1820 **(Figure 40)**.

Tollenaere *et al.* [589] ont montré que les îles de l'Océan Indien présentaient différents types génétiques de *R. rattus*, reflétant des histoires de colonisation différentes par cette espèce. Ainsi les trois génotypes de *R. rattus* identifiés à Mayotte sont très proches des génotypes malgaches et totalement différents des génotypes de *R. rattus* d'Afrique de l'est et d'Europe. Les premiers habitants de Mayotte étant d'Afrique de l'Est, soit les rats de Madagascar étaient les premiers colonisateurs de l'île, soit ils sont arrivés secondairement mais ont supplanté les populations de rats est africaines.

Par contre, La Réunion ne présente qu'un seul génotype de *R. rattus*, similaire à celui rapporté en Europe, Amérique, Afrique du Sud, Afrique de l'ouest et Océanie, qui s'est implanté lors de la colonisation de l'île par les européens.



Source cartes : <http://cdsp.sciences-po.fr>, <http://ascoid.e-monsite.com>.

Figure 40 : Origine géographique des mammifères de La Réunion et de Mayotte (d'après [408]).

2.2. Origines et diversité des *Leptospira* sur les deux îles

Les leptospires peuvent être introduits dans des régions indemnes par l'introduction de rats porteurs de leptospires [14], qui contaminent alors l'environnement et les espèces animales autochtones qui peuvent alors devenir réservoirs. Néanmoins, on peut supposer que les autres mammifères introduits sont également susceptibles d'être porteurs réservoirs de leptospires au niveau rénal et de les disséminer dans l'environnement lors de leur introduction.

Ainsi, pour les différentes souches de *Leptospira* introduites sur les îles, plusieurs scénarios sont envisageables :

- La souche n'a pas les capacités d'adaptation requises pour sa survie dans l'écosystème où elle a été introduite et sa répartition restera donc limitée à sa région d'origine. En effet, certaines souches ne sont décrites que dans une seule zone géographique mais peuvent être adaptées à différents réservoirs [55], par exemple chez des animaux au Pérou [288, 615], en Tanzanie [616], à La

Barbade [617], dans l'environnement en Malaisie [57], chez l'Homme à Mayotte [74]. Il est bien entendu difficile de savoir si ces souches sont réellement limitées à ces régions ou non retrouvées ailleurs car non recherchées. Néanmoins, les phénomènes de dérive génétique et de co-adaptation hôte-pathogènes sont décrits pour d'autres parasites [618, 619, 620] et pourraient être suspectés chez *Leptospira*.

- La souche, introduite avec une espèce mammalienne, n'a pas les capacités de s'adapter aux autres espèces animales hôtes introduites ou autochtones (elle peut être létale pour ces espèces ou ne pas avoir les capacités biologiques pour s'installer au niveau rénal) et ne dépendra que de l'espèce avec laquelle elle a été introduite pour sa survie : cette souche ne se retrouvera donc que chez une seule espèce, et sa survie dépendra de cette seule population d'hôte.
- La souche, introduite avec une espèce mammalienne, a les capacités de s'adapter à plusieurs espèces locales introduites et/ou autochtones, sa survie dépendra alors d'un panel d'hôtes diversifiés, habitant différents milieux. Si en plus cette souche a les capacités de s'adapter aux écosystèmes locaux, elle pourra alors coloniser un grand nombre d'hôtes et d'habitats.

Dans ces deux derniers cas, la transmission pourra se faire soit par contact direct uniquement (si pas d'adaptation à l'écosystème local), soit par contact direct et indirect *via* l'environnement, et les formes cliniques pourront prendre des formes allant d'asymptomatiques à graves en fonction des hôtes et des souches infectantes.

Sur les îles, le regroupement par importation d'espèces réservoirs et de souches de *Leptospira* d'origines diverses peut être à l'origine d'une importante biodiversité "composite" de *Leptospira*, au sein de laquelle les souches restent inféodées à leur réservoir d'origine ou s'adaptent à de nouveaux réservoirs. Il est possible qu'à la faveur de facteurs liés à l'environnement ou à l'hôte, un variant génétique émerge, comme c'est le cas du ST8 à Mayotte (la proportion du nombre de cas dus à ce génotype semble être en augmentation sur l'île) [228].

Les origines des mammifères à La Réunion et Mayotte sont différentes, avec une colonisation préférentiellement européenne à La Réunion et quelques introductions depuis

Maurice (cerf²², musaraigne²³), Madagascar (tenrec, lémurien, zébu) et l'Inde (musaraigne, rat noir²⁴), alors que les espèces présentes à Mayotte sont majoritairement d'origine est-africaine, indienne (civette) et malgache (tenrec, rat, lémur brun)

Par conséquent, on peut suspecter que les leptospires présents sur ces deux îles ont des origines similaires à leurs hôtes et que les souches circulant à La Réunion proviennent principalement d'Europe, tandis que celles circulant à Mayotte sont originaires d'Afrique de l'est et de Madagascar.

Les sérologies conduites à La Réunion démontrent la circulation chez les animaux de sérogroupes "communs" en Europe, telles qu'Icterohaemorrhagiae, Canicola, Panama, Pyrogenes et Sejroe. Au contraire, à Mayotte, les sérums animaux réagissent avec des souches isolées localement, principalement du séro groupe Mini, Grippotyphosa et Pyrogenes. Les sérologies sont le témoin de la différence des souches circulant chez les animaux dans les deux îles. Cette différence peut s'expliquer non seulement par l'origine différente des bactéries, mais aussi par les différences climatiques ou de types de sol (pH, composition du sol) entre les deux îles qui ont conduit à une sélection naturelle des souches introduites avec les mammifères colonisateurs.

Actuellement une seule publication décrit la présence de *Leptospira* à Madagascar (une seule souche identifiée comme *L. interrogans* sérovar Kuwait) [496]. Par contre, les souches est-africaines ont été plus étudiées, elles montrent une relative diversité [58, 389, 390, 621, 622, 623, 624] et certaines souches présentes en Afrique de l'est ont été identifiées comme responsables de cas cliniques à Mayotte. Par exemple la souche mahoraise 200901122 (ST5), similaire à *L. borgpetersenii* sérovar Kenya souche Nijenga [228], a été isolée pour la première fois en 1968 à partir d'un rat fouisseur (*Saccostomus campestris*) au Kenya [624] ; la souche 200801774 (ST6) est similaire à *L. kirschneri* sérovar Grippotyphosa type Moskva souche Moskva [228] a aussi été retrouvée au Zimbabwe.

Les rats introduits à Mayotte depuis l'Afrique de l'est par les premiers colons, s'ils ont été supplantés par les *R. rattus* introduit depuis Madagascar [589], ont néanmoins probablement introduit des souches de *Leptospira* est-africaines. Les souches est-africaines

²² Lui-même originaire d'Indonésie.

²³ Probablement originaire d'Inde.

²⁴ Alors que *R. norvegicus* présent à La Réunion est originaire d'Europe.

ont subi une pression de sélection génétique et certaines ont survécu et se sont adaptées à leurs nouveaux hôtes malgaches, eux-mêmes probablement porteurs d'autres souches de *Leptospira*.

La sélection d'un hôte privilégié chez *Leptospira* est largement décrite. Ainsi, si on considère qu'à Mayotte les différents génotypes de *R. rattus* constituent trois hôtes différents pour *Leptospira*, on peut imaginer que les quatre génomospecies identifiées sur l'île se sont chacune adaptée à un variant génétique de *R. rattus*.

L'origine de la diversité et de l'originalité génétique des souches de *Leptospira* retrouvée à Mayotte [228] doit probablement trouver son origine dans la diversité génétique des souches est-africaines et malgaches.

Comme chez les populations de mammifères introduites dans des milieux insulaires, on peut imaginer que les populations bactériennes introduites subissent un goulot d'étranglement génétique. Lors du fondement d'une population, l'échantillonnage d'individus constituant la population source peut conduire à une réduction de la variation génétique dans la population fondée et à une augmentation de la divergence génétique avec les autres populations existantes [625, 626]. L'effet fondateur peut conduire à une cascade de changements génétiques conduisant à une différenciation évolutive telle qu'elle a été décrite par Mayr [627]. Chez *Leptospira*, on peut supposer que la pression de l'environnement et des hôtes ont contribué à une évolution génétique des populations de *Leptospira* pathogènes qui a conduit à la diversité et à l'originalité des souches circulantes telle qu'on peut l'observer actuellement à Mayotte.

A Mayotte la diversité génétique de *Leptospira* est peut être corrélée à la diversité génétique de son hôte privilégié, *R. rattus*.

Cette hypothèse pourra être vérifiée par le typage génétique des rats noirs porteurs de leptospires.

En suivant cette hypothèse, à La Réunion, la présence d'un seul variant génétique de *R. rattus* laisse supposer une faible diversité génétique des souches circulantes de *Leptospira*.

3. Co-évolution hôte-pathogène et *Leptospira*

Une des questions centrales de l'épidémiologie contemporaine des maladies infectieuses concerne la création et le maintien de la diversité des pathogènes [594]. La notion de co-évolution hôte-pathogène est implicite pour *Leptospira* car exprimée dans la notion même de "réservoir" : « *Generally, coadaptation between the usual host and a variety of Leptospira leads to an asymptomatic infection* » [24]. L'adaptation de *Leptospira* aux rongeurs est acceptée, de même que l'adaptation spécifique des sérovars à une espèce animale en particulier (Canicola pour le chien, Copenhageni pour le rat, Ballum pour la souris...) [9, 73].

Les stratégies évolutives connues pour les pathogènes montrent que ces derniers connaissent généralement une évolution leur permettant de s'adapter à un/des hôte(s), qui assure(nt) ainsi leur survie et leur transmission [628, 629]. L'exemple du virus West Nile qui a su s'adapter rapidement à des hôtes vertébrés et à des moustiques vecteurs, sans historique d'évolution commune avec ces deux hôtes [630] nous laisse percevoir les grandes possibilités d'adaptation des pathogènes pour leurs hôtes vertébrés.

Réciproquement, la cause la plus évidente de la sélection des gènes de l'immunité chez les hôtes est probablement la présence d'un agent pathogène, on parle de sélection dictée par le pathogène ("*pathogen-driven selection*"). Ainsi, à l'échelle d'une région géographique, il existe une corrélation entre la variabilité génétique des hôtes et la diversité des agents pathogènes présents [631].

La réponse de l'hôte à un pathogène est une optimisation basée sur le coût physiologique de la réponse immunitaire *versus* le coût de l'infection par le pathogène sans la mise en œuvre des mécanismes de défense (**Figure 41**) [632]. Ainsi, des hôtes comme le chat ou les rongeurs, fréquemment en contact avec *Leptospira* par l'environnement ou leurs habitudes alimentaires et sociales ont probablement un coût d'adaptation au pathogène intéressant comparé à la pathogénicité potentielle de ce pathogène. A l'inverse, chez les hôtes "accidentels", très sensibles, chez qui l'infection peut être létale, comme l'Homme, le hamster, la gerbille ou le cheval, l'évolution n'a pas favorisé l'adaptation de l'hôte à *Leptospira* car pour ces espèces, moins en contact avec la bactérie, le coût de l'adaptation était trop élevé par rapport aux pertes subies par la présence du pathogène dans cette population d'hôte [632].

Le chat est un carnivore qui se nourrit de proies telles que les oiseaux et les micromammifères. Les micromammifères sont les réservoirs principaux de *Leptospira*, le chat (prédateur), les rongeurs (proies) et *Leptospira* (pathogène adapté aux rongeurs) représentent un système non fermé (puisque les rongeurs et les chats ont des contacts avec d'autres pathogènes, d'autres proies, d'autres prédateurs, et que *Leptospira* peut avoir d'autres hôtes) au sein duquel les contacts sont fréquents. En tant que mammifère, le chat représente un hôte qui peut constituer pour *Leptospira* un réservoir, qui sera résistant à l'infection, ou un hôte accidentel, pour qui l'infection provoquera des signes cliniques.

L'idée que les pathogènes et les hôtes ont des effets évolutifs les uns sur les autres, et que ces effets peuvent être réciproques (c'est-à-dire que les pathogènes et les hôtes co-évoluent) sont des hypothèses attractives dont les implications pour les sciences médicales et vétérinaires commencent seulement à être reconnues [633]. Les agents pathogènes ont toujours été une cause majeure de mortalité dans la population humaine, par conséquent, ils imposent une forte pression de sélection sur le génome humain [631]. Bien que la documentation soit fournie en ce qui concerne la co-évolution de pathogènes et leurs hôtes invertébrés, les plantes ou les bactéries, l'intérêt scientifique pour ce qui est des pathogènes de l'Homme et autres vertébrés est plus récent [630, 631, 634, 635, 636, 637, 638]. Certains pensent que cette co-évolution ne constitue pas un phénomène important, d'autres au contraire, pensent qu'il faut trouver des moyens d'étude autres que ceux utilisés habituellement pour ces hôtes vertébrés, ayant une espérance de vie relativement importante et placés au cœur d'une dynamique complexe d'échanges entre ces hôtes et les populations de pathogènes [631, 633]. Aujourd'hui, les données des études de génétique des populations, qui utilisent notamment une approche par séquençage à haut débit du génome, laissent entrevoir comment la sélection naturelle a façonné l'immunité et les défenses de l'hôte, au sein d'une population en particulier ou à l'échelle de la population humaine globale [631].

La génétique évolutive (qui évalue les conséquences des infections passées sur les caractères génétiques des populations humaines actuelles [636]) souligne le rôle des changements d'environnements et de l'évolution rapide des pathogènes comme deux des principaux facteurs à considérer pour expliquer la vulnérabilité à une maladie [639]. La génétique évolutive des maladies infectieuses recherche les traces évolutives de la sélection naturelle, façonnées par les infections passées et présentes, dans les génomes des populations humaines (ou d'autres vertébrés) saines actuelles. Elle explore comment la sélection naturelle par les infections a permis la variabilité des gènes de défense de l'hôte [636]. Différents

exemples d'évolution du génome humain à la suite de pression environnementale (par des pathogènes) montre que le génome des vertébrés est capable d'adaptation et de co-évolution (exemples du grand polymorphisme des gènes codant pour le système HLA, Human Leucocyte Antigen, et des Killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs) [636].

Des phénomènes de co-évolution se mettent en place entre toutes populations en interaction, proies et prédateurs, compétiteurs ou mutualistes, mais elle est plus importante dans les systèmes hôtes-pathogènes à cause de la nature très "intime" de l'association et des fortes pressions de sélection que chacun peut exercer sur l'autre [633].

La notion de co-évolution doit aussi être un argument permettant d'expliquer que le chat peut être un hôte réservoir de *Leptospira* ou du moins un hôte peu sensible (pouvant être infectés par une souche dont ils ne sont pas réservoirs).

Ainsi, les notions de colonisation et de co-évolution peuvent, du moins en partie, expliquer les épidémiologies différentes de la leptospirose sur ces deux îles de l'Océan Indien.

La co-évolution de *Leptospira* avec une diversité de variants génétiques de son hôte privilégié *R. rattus* (cas de Mayotte), ou au contraire avec un seul variant génétique de cet hôte, explique la diversité (à Mayotte) ou l'homogénéité (à La Réunion) des populations de *Leptospira*.

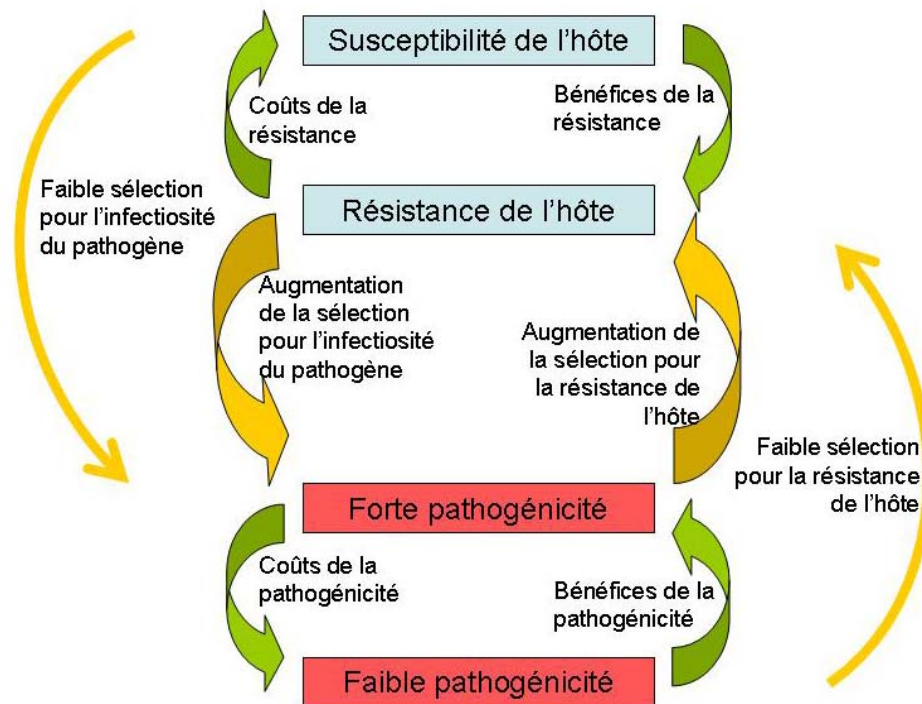


Figure 41 : Représentation schématique du phénomène de co-évolution : réciprocity des changements dus à la sélection dans une espèce (hôte ou pathogène) qui imposent la sélection de changements dans l'autre espèce (pathogène ou hôte respectivement).

Les flèches vertes indiquent la sélection intra-spécifique; les flèches jaunes indiquent la sélection inter-spécifique (d'après [633]).

5. Epidémiologie comparée de la leptospirose sur les deux îles

Le **Tableau 45** compare les résultats pour les espèces communes étudiées à La Réunion et à Mayotte, c'est-à-dire rats noirs, chiens et bovins (l'étude sur les bovins n'a pas été faite dans le cadre de ce travail de thèse).

Tableau 45 : Résultats comparés pour trois espèces animales à La Réunion et à Mayotte, les chiens, les rats noirs, les bovins.

	Chiens errants		Rats noirs		Bovins	
Espèces	La Réunion	Mayotte	La Réunion	Mayotte	La Réunion	Mayotte ^a
Séroprévalence (%)	23/50 (46,0)	7/8 (87,5)	52/66 (78,8)	14/124 (11,2)	30/87 (34,5)	33/284 (11,6)
Prévalence du portage rénal (%)	7/24 (29,2)	nd	50/76 (65,8)	42/141 (29,8)	14/76 (18,4)	nd

^a Résultats de l'enquête conduite par l'Institut Pasteur de Paris en 2010.

nd : Non déterminé.

La méthode utilisée pour l'étude de prévalence du portage rénal a été la même pour les deux études et les résultats sont donc comparables.

La séroprévalence est significativement plus élevée chez les rats noirs à La Réunion qu'à Mayotte ($\chi^2=84,28$; $dl = 1$; $p\text{-value} < 10^{-15}$). La séroprévalence est significativement plus élevée chez les bovins à La Réunion qu'à Mayotte ($\chi^2 = 22,54$; $dl = 1$; $p\text{-value} < 10^{-5}$). Le trop faible nombre de chiens errants prélevés à Mayotte ne nous permet pas une comparaison statistique des séroprévalences. La prévalence du portage rénal est significativement plus élevée chez les rats noirs à La Réunion qu'à Mayotte ($\chi^2 = 30,65$; $dl = 1$; $p\text{-value} < 10^{-7}$).

Pourquoi l'incidence de la leptospirose humaine est-elle très supérieure à Mayotte (> 40 cas pour 100 000 habitants par an contre 8,69 cas pour 100 000 habitants à La Réunion) alors que la séroprévalence et la prévalence du portage rénal chez les principaux mammifères réservoirs sont significativement inférieures à ce qui est observé à La Réunion ?

Plusieurs explications peuvent être avancées :

- L'exposition de l'Homme à *Leptospira* est plus importante à Mayotte et liée au mode de vie et aux conditions sanitaires ;
- L'environnement à Mayotte est plus favorable à la survie et à la transmission de *Leptospira* à l'Homme ;
- Ces différences observées sont liées à un biais d'échantillonnage et les échantillons ne sont pas représentatifs des espèces animales (nombre d'individus trop faible, répartition des sites de capture non homogène...)

Dans les zones rurales, la transmission de la leptospirose est principalement associée à l'élevage d'animaux de rente [306], avec une augmentation du risque pendant la saison des pluies [244]. Avec 15 500 ménages agricoles, éleveurs ou cultivateurs, qui représentent 30% du total des ménages mahorais, Mayotte présente une population rurale importante (8% de la population active déclarée comme "agriculteur" contre 2% à La Réunion), très exposée à la maladie. Dans les zones urbaines, l'infection est généralement associée à la surpopulation, des conditions d'hygiène pauvres, des installations sanitaires inadéquates et à la pauvreté [244]. Or, les conditions sanitaires et de logement à Mayotte sont globalement de qualité inférieure à celles observées à La Réunion (**Tableau 46**). A São Paulo (Brésil), une étude a montré que dans presque la moitié des cas, l'infection avait lieu au domicile, liée à la précarité des conditions de vie [640]. En plus du climat favorable au maintien et à la transmission de la

leptospirose, les facteurs socio-économiques favorisent au maintien d'une forte incidence de la leptospirose à Mayotte.

Tableau 46 : Confort des résidences à Mayotte et à La Réunion.

(Source : INSEE - Recensements de la population de Mayotte 2007 [641]; La Réunion 2006 [642])

Équipement	Mayotte (2007)	La Réunion (2006)
Électricité dans le logement	91,9	99,1
Eau dans le logement	76,2	
W-C / latrines :	65,4	98,3
Douche ou baignoire dans le logement	30,2	95,0

Plusieurs études montrent que la leptospirose, associée aux activités de loisirs dans les pays développés, est, au contraire, associée à un faible statut socio-économique dans les régions tropicales et/ou moins développées, avec une incidence qui augmente en saison des pluies [640, 643, 644]. Figueiredo *et al.* [645] ont observé que dans la ville de Belo Horizonte (Brésil) les cas apparaissent surtout dans les zones sans infrastructures sanitaires adéquates, présentant des accumulations de déchets et sans système de ramassage des ordures. Soares *et al.* [640] suggèrent que l'incidence de la leptospirose peut être considéré comme un indicateur du niveau social d'un pays/d'une région.

Bien que le réservoir animal semble moins contaminé à Mayotte qu'à La Réunion, il est probable qu'à Mayotte, les conditions climatiques et les facteurs socio-économiques favorisent le maintien de la bactérie dans l'environnement d'une part, et sa transmission d'autre part.

Les données de sérologie et de biologie moléculaire montrent que le sérotype Icterohaemorrhagiae ne circule ni chez l'Homme [228] ni chez les animaux à Mayotte où nous avons montré que *R. rattus* était l'hôte réservoir de quatre espèces de leptospires pathogènes circulant aussi chez l'Homme. Au contraire, à La Réunion les résultats sérologiques (certes, non confirmés par isolement ou séquençage) montrent que *L. interrogans* sérotype Icterohaemorrhagiae est responsable de la majorité des cas cliniques humains et qu'il est le principal sérotype circulant chez les rats.

La différence majeure dans l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion et à Mayotte est l'absence du sérotype Icterohaemorrhagiae à Mayotte aussi bien chez l'Homme que chez les animaux (**Figure 42**) alors qu'il est le principal sérotype responsable des infections humaines à La Réunion et le sérotype majoritaire retrouvé chez les rats sur cette île.

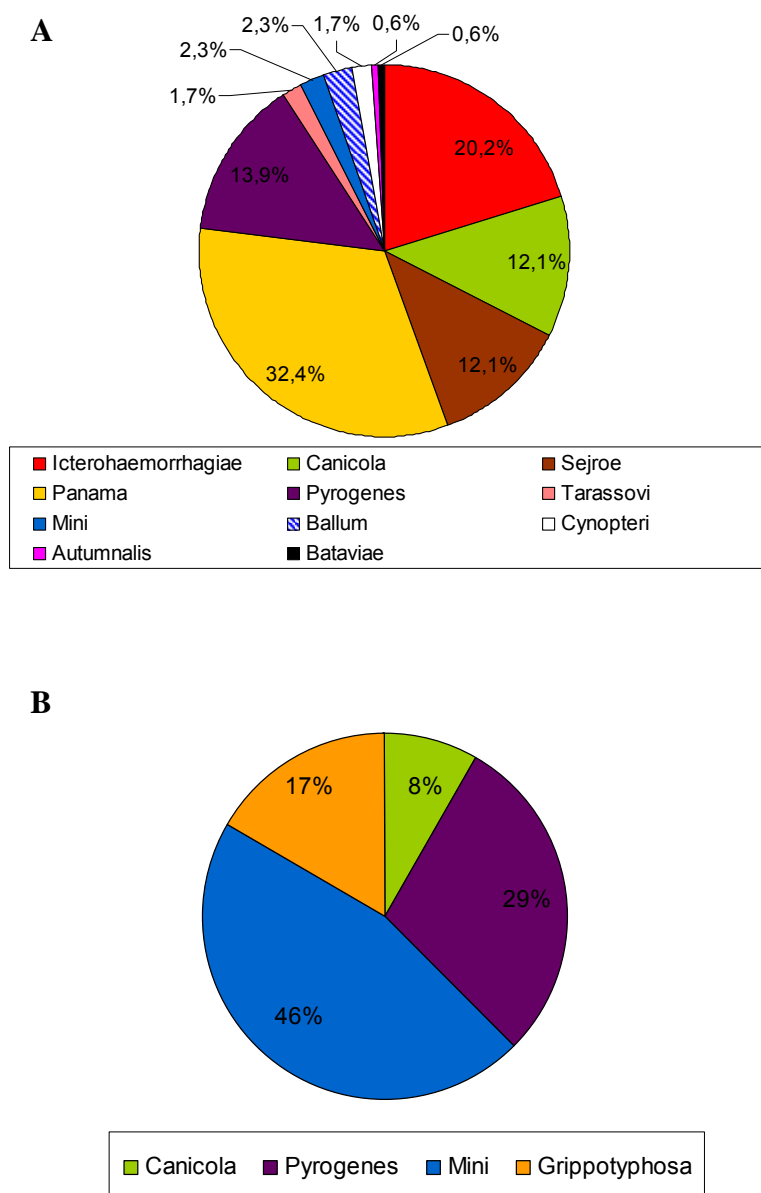


Figure 42 : Sérotype identifiés par MAT chez les animaux de deux îles de l'Océan Indien.

A. Résultats sérologiques sur douze espèces animales de la Réunion ; B. Résultats sérologiques sur quatre espèces animales de Mayotte (les données sur les chiens domestiques ne sont pas incluses car biaisées par la vaccination).

On observe que chez les animaux, la diversité des sérogroupes circulant est supérieure à La Réunion, avec onze sérogroupes identifiés, tandis que seulement quatre sérogroupes ont été retrouvés à Mayotte. Cette différence peut néanmoins provenir du panel d'antigène utilisés : pour les sérums de La Réunion nous avons utilisé un panel de 17 antigènes composé de souches de référence, et pour ceux de Mayotte nous avons utilisé un panel de 11 souches dont 9 sont des souches isolées localement. De plus, les espèces et le nombre d'animaux étudiés sur les deux îles sont différents. Il est par conséquent difficile de tirer des conclusions avancées sur la diversité des sérogroupes.

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la différence dans les souches circulant à La Réunion et à Mayotte :

1/ Hypothèse liée à l'historique de la colonisation des îles par les hôtes de *Leptospira*

La biodiversité originelle des souches (issues d'Europe pour La Réunion, d'Afrique de l'est et de Madagascar pour Mayotte) s'est maintenue sur les deux îles, sans échange de souches entre ces deux territoires (où s'il y a eu échange, sans maintien des souches dans leur nouvel environnement). L'absence du séro groupe Icterohaemorrhagiae à Mayotte peut trouver son origine dans le fait que la colonisation de l'île s'est faite par quelques individus (la colonisation d'un territoire est généralement le fait d'un petit nombre d'individus [488, 646]), de différentes espèces animales, non porteurs de souches appartenant à ce séro groupe. Le séro groupe Icterohaemorrhagiae n'aurait donc pas été importé à Mayotte avec les animaux colonisateurs lors de la première vague de colonisation. Si ce séro groupe a été introduit par la suite, il semble qu'il n'ait pas trouvé de niche écologique propice à sa survie. Néanmoins, cette hypothèse souligne l'importance de la lutte contre l'introduction d'animaux, en particulier les rats, principaux réservoirs d'Icterohaemorrhagiae.

2/ Hypothèse liée au contexte écologique

Les leptospires pathogènes sont transmis *via* les sols (notamment tropicaux) et les eaux douces, où ils survivent pendant plusieurs mois, à la faveur d'un environnement chaud et humide [647]. La survie à long terme de ces bactéries est vraisemblablement associée à une agrégation cellulaire, la formation d'un biofilm et l'attachement à des particules [648, 649], dans des eaux douces, stagnantes ou s'écoulant doucement [581]. La présence de leptospires dans l'eau est positivement corrélée à la turbidité de l'eau [650]. Il est probable que le type de

sol et d'eau (différents entre les deux îles) et le climat (un peu plus chaud et humide à Mayotte) permettent des durées de survie des souches différentes entre ces deux îles ;

3/ Hypothèse liée à la faune sauvage

Les deux îles ne présentent pas une biodiversité mammalienne importante. Néanmoins, Mayotte compte deux espèces sauvages, non retrouvées à La Réunion et dont les populations sont relativement importantes : les lémuriens (*Eulemur fulvus*) et les roussettes (*Pteropus seychellensis*). Ces deux espèces, pouvant vivre à proximité de l'Homme, contribuent-elles de manière significative au maintien de certaines souches de *Leptospira* ? De même, quelle est la nature et l'importance de la circulation des leptospires entre roussettes, rats et lémuriens, tous trois partageant des écosystèmes anthropisés ?

4/ Hypothèse liée à la diversité génétique de *R. rattus* à Mayotte

La population de rats noirs à La Réunion est homogène génétiquement (un seul variant génétique réparti sur l'ensemble de la surface de l'île), alors qu'à Mayotte trois variants génétiques sont retrouvés. La diversité génétique des souches de leptospires à Mayotte est-elle liée à celle du rat noir ?

Il existe cependant un biais dans la comparaison entre les deux îles lié à la recherche des souches circulant chez les patients : à Mayotte, la mise en évidence de la diversité des souches circulant est surtout due à l'effort de détection par la mise en culture du sang des patients malades [74] qui n'est pas faite systématiquement à La Réunion.

Avec un climat chaud et humide, et une densité de micromammifères réservoirs aussi importante, La Réunion et Mayotte constituent des environnements idéaux pour la survie et la transmission des leptospires. Les rats sont abondants dans tous les écosystèmes : champs de canne, vergers, ravines, forêts, villes, et constituent, avec les souris et les musaraignes (à La Réunion) le réservoir sauvage le plus important de leptospirose. Dans les deux îles, il est par conséquent nécessaire de considérer ces micromammifères comme des vecteurs majeurs de *Leptospira*, représentant un danger pour la santé humaine et celle des animaux domestiques.

De même, la population de chiens errants est très importante aussi bien à La Réunion qu'à Mayotte. La séroprévalence de la leptospirose chez les chiens (et la prévalence du portage rénal estimée à La Réunion, **Tableau 45**) nous montrent que, sur les deux îles, les chiens errants représentent un risque de santé publique majeure vis-à-vis de la leptospirose. Ils

représentent aussi un risque pour les chiens domestiques, qui, protégés uniquement contre les deux sérogroupes inclus dans le vaccin disponible en France, peuvent devenir des réservoirs ou même simplement des vecteurs de *Leptospira* et représenter un réel risque zoonotique au sein du foyer familial [308, 319].

6. Conséquences en santé vétérinaire

4.1. Animaux domestiques

Les animaux domestiques, chiens, chats, nouveaux animaux de compagnie (rats, souris, furets, hamsters...) sont très souvent négligés dans l'évaluation du risque d'infection par *Leptospira* chez l'Homme. Les chiens, parce qu'ils sont le plus souvent vaccinés et, par conséquent, dans l'opinion commune considérés comme protégés donc non porteurs, les chats, parce qu'ils ne sont pas considérés comme potentiellement porteurs par la majorité des praticiens vétérinaires, quant aux rongeurs en cage, on pense rarement à eux comme source de contamination. Pourtant, des cas sont rapportés de contamination par des chiens domestiques [651, 652, 653] ou des rats domestiques [654]. Par ailleurs, nous rappelons que l'infection du chien par *Leptospira* est souvent asymptomatique [359, 655].

La protection de l'infection clinique chez les chiens et de l'installation des bactéries au niveau rénal doivent être les deux objectifs clés de la vaccination [350]. La durée de l'immunité vaccinale chez les chiens varie en fonction des études, mais on reconnaît généralement une durée d'immunité vaccinale d'environ un an [341], bien que cette durée soit controversée. Les anticorps vaccinaux sont stimulés à chaque contact avec une souche sauvage et les titres post-vaccinaux peuvent être très élevés (≥ 1600) [656].

Chez les chiens domestiques, la prévention de la maladie doit passer par l'application d'un protocole de vaccination adapté aux conditions épidémiologiques locales. Cela implique l'utilisation d'un vaccin dirigé contre les sérogroupes circulant localement. Nous avons vu que le vaccin bivalent actuellement disponible en France protégeait contre les deux principaux sérogroupes circulant chez les canidés à La Réunion (*Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*), mais que d'autres souches non comprises dans le vaccin circulaient sur cette île, laissant présager un changement d'épidémiologie de la leptospirose chez les chiens, comme cela a été observé

aux Etats-Unis [263, 655] et dans certains pays d'Europe [334, 657] où le vaccin bivalent Icterohaemorrhagiae/Canicola a été utilisé depuis plus longtemps que dans les Départements français d'Outre-Mer.

A Mayotte, la question de l'intérêt de la vaccination des chiens avec le vaccin bivalent se pose. En effet, notre étude ne prouve pas la circulation des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola chez les chiens domestiques, par contre, nous montrons l'absence de circulation de ces deux sérogroupes dans la population de chiens errants (ainsi que chez les autres animaux explorés à Mayotte), ce qui laisse supposer que ces deux sérogroupes ne sont pas présents sur l'île, ou que leur prévalence est faible. A Mayotte, la diversité des souches circulant chez les rats et les chiens errants laisse supposer que la protection des chiens domestiques par le vaccin bivalent est probablement insuffisante ou se révélera insuffisante dans quelques années. L'utilisation d'un vaccin canin contenant (au moins) la valence Mini pourrait-elle être envisageable à Mayotte?

Un approfondissement des connaissances sur les souches de leptospires circulant chez les chiens à Mayotte est un préalable indispensable à l'évaluation de l'utilité du vaccin bivalent et de l'intérêt de son utilisation à Mayotte. La lutte contre la leptospirose canine, zoonose majeure, doit s'inclure dans la lutte globale contre la maladie.
--

Par ailleurs, l'incidence de la leptospirose connaît chez le chien des variations intra- et inter-annuelles [141, 658], ainsi qu'en fonction de la pluviométrie [267, 515] et le protocole vaccinal doit prendre en compte les saisons à risque accru pour les animaux (saison des pluies en particulier).

Le MAT est peu prédictif du séro groupe infectant, mais à l'échelle d'une population, il permet toutefois d'avoir une idée assez correcte du/des sérogroupes circulant [323]. L'immunité de la leptospirose étant spécifique de séro groupe, il est donc nécessaire de connaître les sérogroupes circulant localement afin d'avoir une idée de l'efficacité potentielle de la vaccination dans la population canine [226]. Néanmoins, des études montrent que l'immunité vaccinale induit aussi une immunité partielle envers des sérogroupes non inclus dans le vaccin [659, 660, 661].

Notre étude a permis de montrer qu'à La Réunion, les sérogroupes *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* sont prédominants dans les populations de chiens. Il est important de suivre l'évolution des sérogroupes circulant dans la population canine réunionnaise afin d'évaluer l'intérêt de la vaccination des chiens domestiques avec le vaccin bivalent sur cette île.

Des mesures de prophylaxie autres que la vaccination, non disponible pour les chats, peuvent être prises pour protéger les animaux domestiques de l'infection par *Leptospira* :

- Instauration d'une période de quarantaine pour tout carnivore domestique ou les nouveaux animaux de compagnie entrant sur les territoires réunionnais et mahorais, pendant laquelle des tests sérologiques pourraient être conduits
- Limiter les baignades en eaux douces ;
- Eviter la divagation des animaux domestiques qui peuvent, en ces occasions, être en contact avec des animaux errants excréteurs ou des environnements contaminés ;
- Lutter de façon collective, raisonnée, efficace (et peut être de façon saisonnière) contre les rats, souris et musaraignes ;
- Lutter contre les carnivores errants.

4.2. Animaux de rente

Nous montrons qu'une forte proportion du cheptel réunionnais est porteuse de leptospires au niveau rénal. Même si la leptospirose ne représente aucun risque de transmission par l'alimentation, savoir qu'une forte proportion du cheptel est atteinte de cette maladie peut induire une réaction défavorable chez les consommateurs [519]. Par ailleurs, le risque pour les éleveurs, personnels d'abattoir, vétérinaires...est élevé.

Un programme de contrôle optimal contre la leptospirose chez les animaux de rente doit prévenir l'apparition des symptômes cliniques et l'excrétion urinaire chez les animaux pouvant être exposés à différentes souches de *Leptospira*. Une des approches prophylactiques mises en œuvre dans différents pays est la vaccination. Néanmoins, il n'existe actuellement pas de vaccin contre les leptospires possédant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) française, ce qui représente une contrainte majeure à la lutte contre la leptospirose

chez les animaux de rente en France. Mais des pays comme les Etats-Unis, le Brésil, les Pays-Bas, le Royaume-Uni, l'Espagne, le Portugal ou encore l'Italie utilisent la vaccination à grande échelle dans le cheptel bovin et/ou porcin. Il existe différents vaccins commercialisés pour les bovins, certains incluant les valences Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae et Pomona, d'autres sont bivalents et incluent les valences Hardjo et Pomona. Une des limites à l'utilisation de ces vaccins est qu'ils ne protègent que contre quelques sérogroupes et n'empêchent pas l'infection par des sérogroupes non inclus dans la préparation vaccinale.

La vaccination peut aussi être pratiquée chez les cervidés. Une étude pratiquée en Nouvelle-Zélande sur deux troupeaux de cerfs (*Cervus elaphus*) infectés par *Leptospira* a montré que la vaccination d'un troupeau avec un vaccin bivalent (*L. interrogans* sérovars Pomona et Hardjo) ne présentait pas de meilleurs résultats de taux de fécondation qu'un troupeau non vacciné, mais par contre, la vaccination permettait de réduire les mortalités périnatales [662].

D'autres mesures de lutte peuvent être appliquées, notamment la détection des animaux porteurs au sein du troupeau, leur isolement, et l'élimination de la bactérie par un traitement antibiotique efficace [411, 522, 663, 664]. Il est aussi important d'assécher les zones humides dans les bâtiments d'élevage et d'éviter de mettre les animaux dans des pâtures humides (bien que cela soit difficile à réaliser).

La lutte contre les rongeurs, musaraignes et animaux errants est un des points majeurs de la lutte contre la leptospirose dans les élevages d'animaux de rente [411]. Il faut éliminer les micromammifères des bâtiments d'élevage, lutter au niveau des silos ou des stocks de grains qui attirent les micromammifères (**Figure 43**), mais aussi au niveau des auge où les animaux réservoirs peuvent uriner, et éviter les pâtures communes avec des animaux de statut inconnu [528].

Tout animal nouvellement introduit au sein d'un élevage doit subir une période de quarantaine stricte [411] permettant d'effectuer des tests sérologiques, voire une détection de *Leptospira* au niveau urinaire. Ces mêmes tests doivent être pratiqués sur les animaux utilisés en monte naturelle car la transmission vénérienne de *Leptospira* a été démontrée chez les bovins [665, 666], les caprins [404], et les porcs [9, 667]. Enfin, les semences utilisées pour l'insémination artificielle doivent être contrôlées vis-à-vis de cette maladie [400, 401, 404, 668, 669, 670].

Néanmoins, à Mayotte, cette mesure reste relativement complexe à mettre en œuvre du fait des nombreuses introductions illégales d'animaux sur l'île, notamment depuis les Comores.

La détection des troupeaux infectés pourrait aussi se faire par la détection des lésions rénales macroscopiques à l'abattoir (points blancs dans le parenchyme rénal) [671, 672], si ces lésions étaient systématiques et suffisamment spécifiques. Néanmoins, des études montrent que l'absence de lésion ne signifie pas que l'animal n'est pas infecté par *Leptospira* [673]. En effet, Chappel *et al.* [674] montrent que 7,5% des porcs examinés présentant des reins normaux étaient infectés par *Leptospira* et que 23,5% des reins présentant des points blancs étaient contaminés. Enfin, une autre étude montre qu'aucune lésion macroscopique au niveau des organes reproducteur n'a été mise en évidence chez 16 truies séropositives au MAT [675].

La recherche des lésions rénales macroscopiques à l'abattoir ne peut constituer une méthode efficace de détection des animaux porteurs de *Leptospira*.



Figure 43 : Exemple de zone attractive pour les rats dans une exploitation bovine.

Les éleveurs doivent veiller à ce que les silos soient fermés et à ce que les granulés tombés hors du silo soient ramassés. De plus, les friches aux abords de l'élevage doivent être éliminées, ces écotones représentent des zones favorables aux rats.

7. Intérêt de ce travail pour la santé humaine

7.1. Coût de la maladie

Peu de recherches ont été menées sur les conséquences économiques de la leptospirose, de sorte qu'on manque d'informations sur le coût sociétal de cette maladie, notamment le coût des soins de santé, de la perte de productivité due aux séquelles de la maladie mais aussi des pertes de productivité agricole [220].

En Nouvelle-Calédonie, le coût de l'épidémie de leptospirose du premier semestre de 2008 a été estimé à 5361 euros par patient (157 patients diagnostiqués) [172]. En incluant le coût des diagnostics négatifs et de la prévention, le coût global de cette épidémie a été estimé à 984 472 euros, soit 3,95 euros par habitant [172].

Au Brésil, l'impact financier de la leptospirose a été estimé à 22,9 millions de réals (~ 9,5 millions d'euros) en 2007 pour le manque à gagner des salariés, tandis que les coûts hospitaliers s'élèveraient à 831 500 réals (~ 344 590 euros) pour cette même année [676].

Par ailleurs, en plus du coût lié aux malades, il existe un coût important lié aux campagnes de prévention, à l'édition de prospectus, le tournage de spots publicitaires pour la télévision ou la radio... Les dépenses liées à la prévention ont été estimées à 25 024 euros en Nouvelle-Calédonie en 2008 [172].

Enfin, une des dépenses majeures dans la prévention et le contrôle de la leptospirose est celle liée aux campagnes de dératisation. Cette dépense annuelle a été évaluée à 27 020 euros pour la seule ville de Nouméa (Nouvelle-Calédonie) [172].

A La Réunion, le raticide (antagoniste de la vitamine K) le plus utilisé est la bromadiolone, mélangée avec du maïs concassé (0,005%), et conditionnée dans des sachets de 30 g. Le difénacoum peut aussi être utilisé, et depuis peu le brodifacoum (0,001%) est disponible sur l'île [677]. La Fédération Départementale des Groupement de Défense contre les Organismes Nuisibles de la Réunion (FDGDON) coordonne deux campagnes de dératisation par an dans la plupart des communes de l'île : la première campagne se déroule de mi-mars à fin mai, lorsque les cannes à sucre sont en pleine croissance ; la seconde campagne a lieu de mi-octobre à mi-décembre lorsque la coupe est déjà avancée et que les rats se réfugient dans les parcelles encore hautes pour trouver un abri [677]. Ces campagnes visent à

protéger les agriculteurs vis-à-vis de la leptospirose et à limiter les pertes agricoles directes liées aux rats. Entre 2006 et 2011, c'est en moyenne 65 tonnes de raticides qui sont distribués annuellement par le FDGDON (sur la base de 3 kg/ha). Le coût annuel de ces campagnes de dératisation est élevé, en 2011 le seul coût du raticide était de 3,66 euros/kg, soit environ 240 000 euros/an (*Didier Pastou, directeur du FDGDON Réunion*). Ces quelques chiffres nous montrent que les moyens mis en jeu dans la lutte contre les rats sont très importants à La Réunion et leur coût très élevé.

7.2. Population à risque et mesures de prévention

La séroprévalence globale retrouvée chez les treize espèces étudiées à La Réunion et la prévalence du portage rénal montrent que la population réunionnaise est très exposée à la maladie. A Mayotte, les séroprévalences estimées dans les populations de quatre espèces de mammifères sauvages (lémurs, rats, roussettes, chiens errants), montre l'importance du risque zoonotique représenté par les rats et les chiens en particulier, et le risque potentiel représenté par les lémuriens et les roussettes.

Si les éleveurs, vétérinaires, personnels d'abattoir et éboueurs sont considérés comme une population très exposée professionnellement [9, 13], à La Réunion aussi bien qu'à Mayotte, on peut considérer l'ensemble de la population comme "à risque". En effet, les rongeurs et les musaraignes sont présents dans tous les écosystèmes, et vivent proches de l'Homme. De plus, les chiens et chats errants représentent une population importante, qui participe à la contamination environnementale des écosystèmes ruraux et urbains.

Les rongeurs véhiculent principalement le sérotype Icterohaemorrhagiae à la Réunion, le sérotype Mini à Mayotte. Ils semblent être les réservoirs principaux pour la contamination humaine dans ces deux îles.

La lutte contre les micromammifères est un point essentiel de la lutte contre la leptospirose humaine à La Réunion et à Mayotte.

Nos résultats sérologiques montrent que les personnes en contact avec des animaux de rente sont exposées aux sérotypes Panama, Pyrogenes et Sejroe, alors que les personnes ne possédant aucun animal de rente et qui n'entrent pas en contact avec eux et fréquentent peu les milieux ruraux ont moins de risque d'être exposés à ces sérotypes. Les personnes travaillant

au contact des animaux de rente (éleveurs, transporteurs, personnel d'abattoir, personnel des services vétérinaires) doivent être informés du risque lié à la transmission de la leptospirose par les animaux de rente, et se protéger par le port de vêtements de protection (gants, bottes, lunettes). Ils doivent aussi être informés de la nécessité de se désinfecter en cas de contact d'une plaie avec les urines des animaux [528].

En Nouvelle-Zélande, le nombre de cas de leptospirose humaine a fortement baissé entre les années 1950 et 1990 grâce à une importante campagne de vaccination du cheptel bovin dirigée contre *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo et *L. interrogans* sérovar Pomona, les deux sérovars les plus retrouvés chez les patients et qui a débuté dans les années 1980 [681]. Néanmoins, durant cette période, une augmentation de la proportion de cas due à *L. interrogans* sérovar Ballum a été observée. La vaccination a donc permis, outre une réduction du nombre de cas de leptospirose humaine annuel, un changement dans l'épidémiologie de la maladie [681].

La vaccination du cheptel est un moyen de lutte efficace contre la leptospirose humaine.

Le vaccin disponible pour l'Homme est un vaccin monovalent qui protège contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae, mais ce vaccin est peu efficace [678]. Notre étude montre que les sérogroupes circulant chez les animaux à La Réunion sont divers. La vaccination induit un sentiment de "protection" chez les personnes vaccinées alors qu'elles peuvent être infectées par un séro groupe autre qu'Icterohaemorrhagiae. Néanmoins, Icterohaemorrhagiae est le séro groupe majoritaire retrouvé chez les patients hospitalisés à La Réunion [201, 416], et il est le séro groupe principal retrouvé chez les rats. Le vaccin peut par conséquent être indiqué chez des personnes susceptibles d'être en contact avec les rongeurs. Par contre, ce vaccin est peu adapté pour les éleveurs, les vétérinaires ruraux et les personnels d'abattoir qui sont plus exposés aux sérogroupes Sejroe, Panama et Pyrogenes par les animaux de rente.

A Mayotte, peu de cas cliniques sont liés au séro groupe Icterohaemorrhagiae. Le vaccin disponible en France semble donc inapproprié à l'épidémiologie de la leptospirose à Mayotte.

La prévalence de la leptospirose dans une population humaine décroît avec l'augmentation du niveau d'éducation de cette population, qui est le plus souvent associée avec un meilleur niveau d'hygiène personnelle [128, 169, 498].

Il est évident qu'un plan rationnel de contrôle doit être basé sur la connaissance des sources d'infections et que la dynamique de l'épidémiologie nécessite un système de surveillance permanent. Ainsi, les mesures de prévention et de contrôles doivent être imaginées sur mesure en fonction de la zone considérée [221]. La lutte contre la leptospirose humaine à La Réunion et à Mayotte doit passer par différentes mesures :

- Un contrôle des populations de rongeurs et musaraignes qui doit se faire de manière à la fois de façon collective et individuelle. Cette lutte doit être continue et intensive ;
- Une diminution des populations de carnivores errants ;
- Une diminution de l'incidence de la maladie chez les animaux de rente (voir mesures plus haut) ;
- Des campagnes régulières de prévention auprès de la population (spots télévisuels ou radiophoniques, flyers, intervention dans les écoles...) ;
- Une information sur les symptômes ;
- Une information sur les pratiques à risque [221] (marcher pieds-nus, utilisation des eaux de pluie, pêche et baignade en eaux douces...) [9, 185, 232] ;
- Une sensibilisation des professionnels de santé humaine et vétérinaire ;
- Un développement des systèmes de drainage des zones inondées [248] ;
- Une meilleure gestion des déchets et de leur élimination [91, 183, 184, 185, 679].

La prévention de la transmission peut se faire par le port de vêtements longs (pour éviter les égratignures et empêcher ainsi la pénétration de la bactérie par voie cutanée), le port de gants, et de bottes (porter des "claquettes" ou marcher pieds-nus sont des facteurs de risque de contamination [185]). Ces mesures ne sont pas toujours "pratiques" à mettre en œuvre (par exemple pour les travailleurs dans les rizières, il est difficile de porter des bottes) [221]. Néanmoins, à La Réunion, ces mesures de prévention basiques pourraient s'appliquer facilement en population agricole puisque les principales cultures sont la canne à sucre, les fruits et légumes, et les principales productions animales sont les ruminants, porcs, et volailles.

La prévention peut aussi passer par l'amélioration du stockage des aliments et la sensibilisation sur le risque d'utiliser les eaux stagnantes ou les eaux de pluie pour les usages de la vie courante (lavage du linge, toilette, lavage des véhicules...) [221].

A cause de la complexité et de la dynamique de l'épidémiologie de la leptospirose, il n'existe pas de règles générales pour la prévention et le contrôle de la maladie dans les populations humaines. Néanmoins, chez les animaux domestiques, les mesures de contrôle sont souvent plus simples à mettre en place. Le contact direct ou indirect avec les urines des animaux excréteurs est la source de l'infection. La prévention et le contrôle doivent donc se focaliser sur la réduction des sources d'infection et la prévention de la pénétration de la bactérie dans le corps de l'hôte accidentel (l'homme).

Les fluctuations d'abondance des populations de réservoirs sauvages sont une explication attractive aux variations temporelles de l'incidence des cas humains de leptospirose. En effet, une forte abondance de réservoirs sauvages, associée à des conditions climatiques favorables [157, 193], favorise la dissémination d'une part et la survie d'autre part des leptospires dans le milieu [307] et induit ainsi une augmentation de l'incidence de la maladie chez les différentes espèces animales, dont l'Homme [503]. En Nouvelle Calédonie, Perez *et al.* [582] montrent que les épidémies de leptospirose humaine dans cette région d'hyper-endémicité surviennent suite à des conditions météorologiques favorables (pluie, chaleur et humidité) conduisant à une augmentation du nombre de rongeurs réservoirs entraînant une augmentation de l'exposition de la population. Une étude conduite en Tanzanie a montré une forte saisonnalité entre l'incidence de la leptospirose chez l'Homme et le pic d'abondance de la population de rongeurs infectés dans les régions agricoles. Leurs résultats indiquent que la suppression des rongeurs par capture plutôt que la réduction de la proportion d'environnements favorables pour les rongeurs avait un meilleur impact sur la réduction du nombre de cas humains de leptospirose [155]. La raison biologique de cette conclusion est que la capture réduit à la fois la survie et l'abondance de la population de rongeurs, tandis que la réduction des habitats réduit effectivement la reproduction et après un court délai, elle réduit aussi l'abondance des animaux. Dans le cas de la réduction des habitats, l'âge de la population de rongeurs augmente mais la prévalence de la leptospirose reste très élevée. Dans le cas de la capture des rongeurs, la survie est réduite mais la reproduction continue à un taux élevé, ce qui implique que le temps moyen d'infection par *Leptospira* est court, réduisant ainsi la capacité de transmission au sein de la population de rongeurs [155].

Néanmoins, une revue des études de terrain sur les rongeurs réservoirs de zoonoses montre que l'existence d'une corrélation positive entre l'abondance des hôtes et la prévalence de la maladie est difficile à établir et que les fluctuations de population chez les rongeurs ne

permet pas d'expliquer la totalité des variations dans l'incidence d'une zoonose chez l'Homme [307].

L'éradication des rongeurs est possible en milieu insulaire, mais généralement l'éradication est un succès sur des îles < 100 hectares (ha) et aucune éradication n'a été faite sur des îles de plus de 1000 ha de surface [680]. Sur des îles densément peuplées et de vaste superficie comme La Réunion et Mayotte, l'éradication totale des populations de micromammifères n'est par conséquent pas envisageable pour le moment.

La synthèse d'Howald *et al.* [680] montre que parmi les 344 tentatives d'éradication des populations de *Rattus* commensaux recensées, 318 ont été couronnées de succès. Le rat surmulot a été éliminé de 104 îles, le rat noir de 159 et le rat du Pacifique de 55, la plus vaste de ces îles étant respectivement dans chaque cas Campbell (Nouvelle- Zélande, 113 km²), L'Hermite (Chili, 10 km²) et Hauturu (Nouvelle-Zélande, 31 km²). Parmi les 49 tentatives d'éradication de populations insulaires de souris (*Mus* sp.), 30 ont on été un succès, la plus vaste des îles bénéficiant de ce succès étant Enderby (Nouvelle-Zélande, 7 km²). Il faut cependant garder à l'esprit que la quasi-totalité de ces îles est inhabitée et qu'en dépit de l'augmentation spectaculaire de la superficie des îles traitées avec succès enregistrée ces vingt dernières années, la plus vaste ne couvre que la superficie de 113 km².

Enfin, la croissance de la population humaine et le développement de système de transport rapides ont permis une connection de l'ensemble des biotopes de la planète. Le résultat en a été une rupture des barrières géographiques et l'introduction de nouvelles espèces dans de nouveaux habitats [630]. Le milieu insulaire a, en théorie, pour avantage un meilleur contrôle des intrants puisque toute arrivée se fait par voie maritime (ports) ou voie aérienne (aéroports) et que des postes de contrôles peuvent être mis en place à ces positions stratégiques. Il est aujourd'hui essentiel de limiter l'introduction de nouvelles souches de leptospires à La Réunion et Mayotte par un contrôle des hôtes animaux de cette bactérie pouvant être introduits sur les îles (arrivée de rats par les bateaux et d'animaux domestiques et de rente par voie aérienne ou maritime).

CHAPITRE IX

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

GLOSSAIRE

Les définitions sont proposées ici au sens utilisé dans le manuscrit. A l'exception des sigles d'organismes, ces définitions proviennent de l'encyclopédie et du dictionnaire Larousse en ligne (<http://www.larousse.fr/encyclopedia> ; <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais>), du site "Internet PubChem Compound" (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), du site Internet de J.P. Euzéby "Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse" (<http://www.bacteriologie.net>), du site Internet français de la CITES (<http://www.cites.org/fra/disc/what.php>), du site Internet "StatSoft Electronic Statistics Textbook" (<http://www.statsoft.com>), de "*Immunologie -Aide Mémoire Illustré*" de D. Male [683] et de l'article de van Belkum *et al.* [684].

- 8-Azaguanine :** Analogue de la purine montrant une activité antinéoplasique (5-amino-2,3-dihydrotriazolo[4,5-d]pyrimidin-7-one).
- Anticorps :** Protéine du sérum sanguin sécrétée par les lymphocytes B (globules blancs intervenant dans l'immunité) en réaction à l'introduction d'une substance étrangère (antigène) dans l'organisme (synonyme : immunoglobuline ou Ig).
- Antigène :** Substance (généralement étrangère à l'organisme), susceptible de déclencher une réaction immunitaire en provoquant la formation d'anticorps.
- Anurie :** Arrêt de la production d'urine par les reins.
- Biodiversité** « La diversité biologique, ou biodiversité, est la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Cela inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs. » (XVIII^e Assemblée générale de l'Union mondiale pour la Nature [UICN], Costa Rica, 1988). Ainsi ce concept prend-il en compte le nombre des espèces vivantes, leurs caractéristiques, et notamment leur matériel génétique (génome), ainsi que les écosystèmes dans lesquels elles s'intègrent.
- Céphalée :** Toute douleur de la tête, quelle que soit sa cause.
- ChikAni :** Distribution et évolution du virus du chikungunya chez les vertébrés des îles de l'Océan Indien". Projet de recherche financé en 2006 par l'INRA puis de 2007 à 2010 par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dont l'objectif était d'étudier la présence du virus du chikungunya chez les vertébrés de la Réunion et de Mayotte. Pour ce faire, deux campagnes de capture et de prélèvement de vertébrés sauvages et domestiques de La Réunion et de Mayotte ont été réalisées en 2006 (en période d'épidémie humaine) et en 2007 (en-dehors de la période épidémique). Le projet était porté par l'INRA avec la collaboration de l'AFSSA (ANSES) de Nancy. De nombreux partenaires ont participé de façon active au projet, notamment le CIRAD de La Réunion, l'IRD, l'INSERM, le GHRS, l'UMR Virologie de Maisons-Alfort, l'ONCFS, le GDS974, les vétérinaires praticiens, le Laboratoire Vétérinaire Départemental, la Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR), le parc zoologique du Chaudron.
- CITES :** La Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction, connue par son sigle CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) ou encore comme la Convention de Washington, est un accord international entre Etats. Elle a pour but de veiller à ce que le commerce international des spécimens d'animaux et de plantes sauvages ne menace pas la survie des espèces auxquelles ils appartiennent.
- Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) :** Syndrome hémorragique caractérisé par la disparition du fibrinogène du sang circulant. L'apparition soudaine de facteurs d'activation de la thrombine provoque la formation de dépôts de fibrine et l'oblitération thrombotique des petits vaisseaux. Cette réaction consomme le fibrinogène, les facteurs V et VIII et les plaquettes. Le sang devient donc incoagulable et des hémorragies surviennent. Survient ensuite une phase réactionnelle avec héparinémie endogène et fibrinolyse.
- Coloration de Gram :** La coloration de Gram, mise au point en 1884, s'effectue en trois temps. Dans un premier temps, les bactéries sont colorées en violet par un colorant basique tel que le violet de gentiane puis par une solution de lugol (mordantage). Dans un deuxième temps, qualifié de temps de différenciation, les bactéries sont soumises

à l'action de l'alcool ou d'un mélange alcool + acétone. Les bactéries se répartissent en deux catégories : celles qui conservent la coloration violette et qui sont qualifiées de bactéries à Gram positif et celles qui sont décolorées et qui sont qualifiées de bactéries à Gram négatif. Dans un troisième temps, afin de mieux visualiser les bactéries décolorées (bactéries à Gram négatif), on procède à un traitement par la fuchsine ou par la safranine. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rouge ou en orange. Lorsque des bactéries à Gram positif sont colorées par la méthode de Gram puis soumises au lysozyme, les protoplastes obtenus sont colorés en violet. Le siège de la coloration se situe donc au niveau du cytoplasme. Les protoplastes traités par l'alcool ou par un mélange alcool-acétone se décolorent instantanément. Le principe de cette coloration peut s'expliquer de la manière suivante : Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et, après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi autorise le passage de l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Ecosystème :	Système formé par un environnement (biotope) et par l'ensemble des espèces (biocénose) qui y vivent, s'y nourrissent et s'y reproduisent.
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) :	Technique sérologique utilisée pour détecter des anticorps ou des antigènes. L'antigène est adsorbé sur une phase solide et l'anticorps à doser est ajouté puis révélé par une protéine couplée à une enzyme (péroxydase ou phosphatase le plus souvent). Dans l'étape finale, on ajoute un substrat chromogène qui est dégradé par l'enzyme en un produit coloré. La densité optique est mesurée après un temps déterminé, elle est proportionnelle à la quantité de substrat chromogène dégradé, elle-même proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés.
Endémique :	Se dit des espèces vivantes propres à un territoire bien délimité. Se dit d'une maladie infectieuse présente de façon continue au sein d'une population ou d'une région.
Epidémie :	Développement et propagation rapide d'une maladie contagieuse, le plus souvent d'origine infectieuse, dans une population. Le mot épidémie (du grec epi, sur, et dêmos, peuple, littéralement « qui circule dans le peuple ») qualifie soit l'apparition d'un grand nombre de cas d'une nouvelle maladie, soit l'accroissement considérable du nombre de cas d'une maladie déjà existante, dans une région donnée, au sein d'une communauté ou d'une collectivité.
Epidémiologie :	Étude des maladies épidémiques, de leur mode de contagion et des moyens de les combattre.
Epidémiologie bactérienne :	Étude de la dissémination des bactéries pathogènes, incluant leur schéma de transmission, les facteurs de risque et le contrôle de l'infection dans les populations (humaines ou animales) ,
Epistaxis :	Saignement de nez (synonyme : rhinorrhagie).
Espèces (<i>species</i>) :	Taxon de base bactérien, nom du group en-dessous du genre, dont les membres montrent un fort degré de similarité globale, comparée avec les autres souches plus distantes. Il n'y a actuellement pas de définition d'espèces universellement acceptée en bactériologie.
Génisse :	Femelle de l'espèce bovine qui n'a pas encore mis bas.
Génomospecies (Espèce génomique) :	Selon l'International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB), une espèce est définie génétiquement (génomospecies) comme le rassemblement de souches ayant des relations ADN-ADN qui se traduisent à la fois par des valeurs d'hybridation supérieures ou égales à 70 p. cent et par une valeur $\Delta T_{m(e)}$ inférieure ou égale à 5 C.
Génotype :	Profil génétique d'un organisme étudié par une méthode de biologie moléculaire.
Guano :	Nom donné aux excréments des oiseaux marins et des chauves-souris. Le guano est constitué d'ammoniac ainsi que d'acides uréiques, de phosphore, d'acides oxaliques et carboniques, et de certains sels et impuretés.

Hématémèse :	Vomissement de sang d'origine digestive.
Hématurie :	Présence de sang dans l'urine.
Hépatomégalie :	Augmentation anormale du volume du foie.
Hétéroduplex :	Acide nucléique bicaténaire dans lequel les deux brins ne possèdent pas uniquement des séquences rigoureusement complémentaires.
Homoduplex :	Acide nucléique bicaténaire dont toutes les bases sont appariées.
Immunoglobulines de type G (IgG) :	Sous-classe d'anticorps. C'est l'immunoglobuline sérique majeure, elle constitue le principal anticorps au cours de la réponse secondaire (mémoire) à la plupart des antigènes.
Immunoglobulines de type M (IgM) :	Sous-classe d'anticorps. C'est la première classe d'immunoglobulines qui est produite au cours du développement de la réponse immunitaire.
Incidence :	Nombre de nouveaux cas d'une maladie constatés pendant une période déterminée et dans une population donnée (Organisation Mondiale de la Santé). L'incidence est un rapport qui s'exprime en nombre de cas pour 100 000 habitants.
Isohyète :	Se dit d'une courbe joignant les points recevant la même quantité de précipitations.
Isolat :	Une population de cellules bactériennes en culture pure, dérivant d'une unique colonie. En microbiologie clinique, les isolats sont généralement issus de cultures primaires obtenues à partir d'un patient.
Kaliémie :	Taux de potassium dans le plasma sanguin.
Lipoprotéine :	Substance formée par l'association de protéines (appelées apolipoprotéines) et de lipides (cholestérol, triglycérides).
Lymphadénopathie :	Atteinte des noeuds lymphatiques qui augmentent de volume, peuvent devenir douloureux, inflammés (lymphadénite).
Maladie de Lyme :	Maladie infectieuse articulaire, neurologique et cardiaque, dont l'agent est une bactérie de la famille des spirochètes, <i>Borrelia burgdorferi</i> (synonyme : borréliose de Lyme).
Maladie émergente :	L'Office International des Epizooties (OIE) définit (en 2006) les maladies émergentes comme des <i>infections nouvelles, causées par l'évolution ou la modification d'un agent pathogène ou d'un parasite existant</i> . Le caractère « nouveau » de la maladie se traduit par exemple par un changement d'hôtes, de vecteur, de pathogénicité ou de souche.
Méléna :	Émission par l'anus de sang digéré (de couleur noire) par le tube digestif. Un méléna traduit une hémorragie digestive haute, c'est-à-dire provenant de l'œsophage, de l'estomac ou du duodénum.
Méningite aseptique :	Inflammation méningée avec des cultures bactériennes de routine négatives.
Microscope à fond noir :	Le microscope à fond noir qui utilise le principe de la « microscopie en champ sombre » permet d'améliorer le contraste d'échantillons transparents mais non teintés. Dans la microscopie à fond noir, l'image est créée par la diffraction de la lumière. La lumière diffractée par la préparation permet la formation de l'image. Sans préparation, la lumière n'arrive pas à l'objectif d'où le fond noir. La préparation donne donc une image sur fond noir.
Multi Locus Sequence Typing (MLST) :	Technique de génotypage consistant à rechercher les variations dans les séquences alléliques de plusieurs gènes de ménage (généralement 5 à 10).
Myalgie :	Douleur musculaire.

Oligurie :	Diminution du volume des urines (chez l'Homme, moins de 500 ml / 24h).
Pathogène :	Qualifie ce qui provoque une maladie, en particulier un germe capable de déterminer une infection. Une bactérie est pathogène du fait de sa virulence (pouvoir de multiplication), de sa production de toxines ou d'enzymes, ou de leur association.
Pathogénicité :	Capacité biologique à provoquer une maladie.
Pétéchie :	Petite lésion rouge vif ou bleutée de la peau ou des muqueuses. Les pétéchies, dues au passage de globules rouges hors des vaisseaux sanguins, mesurent de 1 à 3 mm.
Philopatrie :	Tendance de certains individus à rester ou à revenir à l'endroit où ils sont nés.
Plasmide :	Molécule d'ADN extrachromosomique capable de se répliquer indépendamment et portant des caractères génétiques non essentiels à la cellule hôte (certains plasmides sont utilisés comme vecteurs de clonage).
Polyandrie :	Cas particulier de la polygamie, dans lequel une femelle peut avoir plusieurs mâles.
Polygynie :	Cas particulier de la polygamie, dans lequel un mâle peut avoir plusieurs femelles.
Population :	Groupe d'organismes de la même espèce habitant dans un environnement donné.
Prévalence :	Rapport du nombre de cas d'un trouble morbide à l'effectif total d'une population, sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, à un moment ou pendant une période donnés.
Processus auto-immun :	Processus pathologique au cours duquel le malade est victime de ses propres défenses immunitaires.
Pseudogène :	Gène dont la séquence est voisine des gènes de structure fonctionnels, mais qui ne s'exprime pas.
Récepteur TLR (Toll-Like Receptor) :	Protéines transmembranaires, présentes à la surface de certains types cellulaires chez l'Homme et les mammifères et qui sont homologues au produit du gène de drosophile Toll. Ces récepteurs très conservés par l'évolution jouent un rôle important dans l'immunité innée et notamment dans les défenses contre les microorganismes. Ils peuvent reconnaître des motifs moléculaires uniquement présents chez ces microorganismes pathogènes dénommés PAMP pour "pathogen-associated microbial pattern". Parmi ces PAMPs on trouve : - des composants des parois bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycans ou la flagelline composant du flagelle de certaines bactéries, - de l'ADN bactérien, -de l'ARN viral double brin. TLR2 reconnaît une variété de PAMPs incluant les lipoprotéines bactériennes, les peptidoglycans et les acides lipotéichoïques. TLR4, sa localisation est controversée. Il est activé par les LPS bactériens
Rhabdomyolyse :	Destruction du tissu des muscles striés, entraînant la libération dans le sang d'un pigment musculaire toxique, la myoglobine. Une rhabdomyolyse se traduit par des douleurs des muscles atteints et une coloration foncée des urines. Au niveau sanguin, on note une augmentation de la la créatine phosphokinase.
Saignement subarachnoïde :	Un saignement subarachnoïde consiste en un saignement de la surface du cerveau, dans la région située entre le cerveau et la boîte crânienne.
Saprophyte :	Bactérie ou champignon microscopique vivant dans la nature aux dépens de matières organiques qu'ils contribuent à dégrader (dans le cas particulier de <i>Leptospira</i> , "saprophyte" est opposé à "pathogène").
Sensibilité :	La sensibilité d'un test ou d'un examen diagnostique est sa capacité de donner un résultat positif lorsque la maladie (ou la condition) est présente.
Sérogroupe :	Ensemble des caractéristiques antigéniques de certains micro-organismes

	(bactéries, virus, champignons), permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce.
Séroprévalence :	Nombre de personnes dans une population donnée qui répond positivement à des tests sériques spécifiques. Elle est souvent présentée sous forme de pourcentage.
Sérovar :	Désigne une propriété antigénique permettant d'identifier une cellule (bactéries, globule rouge, etc.) ou un virus par des méthodes sérologiques. La technique est souvent appelée le sérogroupage. Le taxon de base pour les leptospires est le sérovar et les sérovars apparentés sont rassemblés dans des sérogroupe.
Souche (strain) :	Descendants d'un isolement unique en culture pure, généralement dérivé d'une colonie unique initiale. Une souche peut être considérée comme un isolat ou un groupe d'isolats qui peuvent être distingués des autres isolats des mêmes genres et espèces, par des caractères phénotypiques et génétiques. Les cultures d'un microorganisme particulier, isolées au même moment à partir de plusieurs endroits chez un même patients, et non différenciés par typage, sont aussi considérées comme une souche unique.
Souche type (type strain) :	Une souche qui est maintenue en culture pure, et qui définit une espèce, elle en est le représentant (il n'y a qu'une souche type par espèce). Une souche type est identifiée par la lettre T à la suite de son numéro d'enregistrement. La souche type est souvent un des premiers spécimens décrit pour l'espèce.
Spécificité :	Capacité d'un test ou d'un examen de donner un résultat négatif lorsque la maladie n'est pas présente.
Splénomégalie :	Augmentation pathologique du volume de la rate.
SYBR Green :	Composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il est le principal marqueur séquence aspécifique utilisé en PCR en temps réel.
Syndrome de Guillain-Barré :	Polyradiculonévrite inflammatoire avec présence d'albumine dans le liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Ce syndrome se manifeste par une inflammation aiguë et démyélinisation (destruction de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses) des nerfs périphériques, responsables de paralysies.
Syphilis :	Maladie infectieuse sexuellement transmissible due à une bactérie, <i>Treponema pallidum</i> (tréponème pâle).
Tableau de contingence :	Tableau statistique mettant en évidence, parmi un groupe d'individus, un échantillon ou une population, une distribution d'un certain caractère A pour chaque catégorie ou tranche d'un autre caractère B, et réciproquement. (La distribution de A et celle de B figurent dans les deux marges du tableau).
Taurillon :	Jeune mâle de l'espèce bovine élevé et nourri intensivement pour la production de viande.
Taxonomie :	Etude théorique de la classification des organismes, qui implique les activités reliées d'allocation de taxa aux organismes, leur nomenclature et identification.
Thrombocytopénie (ou thrombopénie) :	Abaissement du nombre des plaquettes (chez l'Homme, on parle de thrombocytopénie au-dessous de 150 000 par millimètre cube de sang).
Titre d'anticorps :	Concentration minimum en anticorps nécessaire à la réaction d'agglutination.
Transposase :	Enzyme se liant à un transposon (séquence d'ADN pouvant changer de position) et catalysant la migration de ce transposon dans une autre région du génome.
Typage (typing) :	Analyse phénotypique et/ou génétique des isolats bactériens, en-dessous du niveau de l'espèce ou de la sous-espèce, et effectué en vue d'obtenir des données génétiques spécifiques d'une souche/d'un clone, qui pourra être utilisé pour l'étude des schémas de transmission des infections, trouver les réservoirs et les sources des infections humaines.

Variable Number Tandem Repeat (VNTR) :	Courte séquence nucléotidique de 14 à 100 nucléotides de longueur, organisée en clusters de répétitions en tandem, généralement répétées 4 à 40 fois par occurrence. Ces clusters de répétition sont dispersés sur un grand nombre de chromosomes.
Virulence :	Capacité d'un agent infectieux qui détermine l'importance à laquelle se manifeste la maladie dans une population.
Zoonose :	Pour l'Organisation Mondiale de la Santé, une zoonose est une infection ou infestation naturellement transmissible de l'animal à l'Homme et <i>vice versa</i> .

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Noguchi H (1918) Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). The Journal of Experimental Medicine 27: 575-592.
2. World Health Organization (2011) Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG).
3. World Health Organization (2010) Report of the first meeting of the Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group (LERG). Geneva, Switzerland: World Health Organization,. 40 p.
4. Pappas G, Papadimitriou R, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N (2008) The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. Int J Infect Dis 12: 351-357.
5. Ullmann LS, Langoni H (2011) Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 17: 119-129.
6. Rhyan JC, Spraker TR (2010) Emergence of diseases from wildlife reservoirs. Vet Pathol 47: 34-39.
7. Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH (2010) Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. Emerg Infect Dis 16: 1-7.
8. Chomel BB, Belotto A, Meslin F-X (2007) Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. Emerg Infect Dis 13: 6-11.
9. Faine S, Adler B, Bolin C, Pérolat P (1999) *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci. 296 p.
10. Weil A (1886) Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus and Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. Dtsch Arch Klin Med 39: 209-232.
11. Landouzy LTJ (1883) Typhus hépatique. Gazette des hôpitaux civils et militaires 56: 913-914.
12. Kobayashi Y (2001) Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. Journal of Infection and Chemotherapy 7: 10-15.
13. Levett PN (2001) Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 14: 296--326.
14. Marr JS, Cathey JT (2010) New hypothesis for cause of an epidemic among Native Americans, New England, 1616–1619. Emerg Infect Dis 16: 281-286.

15. Stimson AM (1907) Note on an organism found in yellow-fever tissue. Public Health Rep 22: 541.
16. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H (1916) The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). J Exp Med 23: 377-402.
17. Uhlenhuth P, Fromme W (1915) Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). Med Klin: 1202-1203.
18. Hübener EA, Reiter H (1915) Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. Dtsch Med Wochenschr 41: 1275-1277.
19. Dawson B, Hume WE, Bedson SP (1917) Infective jaundice. Br Med J 2: 345-354.
20. Stokes A, Ryle JA (1916) A note on Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica) as it has occurred in the army in Flanders. Br Med J 23: 413-417.
21. Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H (1917) The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). J Exp Med 26: 341-353.
22. (ILS) ILS International Leptospirosis Society (ILS).
23. Harwood CS, Canale-Parola E (1984) Ecology of spirochetes. Annu Rev Microbiol 38: 161-192.
24. Baranton G, Old IG (1995) The Spirochaetes: a different way of life. Bull Inst Pasteur 93: 63-95.
25. Trott DJ, Jensen NS, Saint Girons I, Oxberry SL, Stanton TB, et al. (1997) Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. J Clin Microbiol 35: 482-485.
26. Li C, Motaleb A, Sal M, Goldstein S, F., Charon N, W. (2000) Spirochete periplasmic flagella and motility. J Mol Microbiol Biotechnol 2: 345-354.
27. Johnson RC, Rogers P (1964) Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae with 8-azaguanine. J Bacteriol 88: 1618-1623.
28. Picardeau M, Brenot A, Saint-Girons I (2001) First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. inactivation of *L. biflexa flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Mol Microbiol 40: 189-199.

29. Liao S, Sun A, Ojcius D, Wu S, Zhao J, et al. (2009) Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol* 9: 253.
30. Charon NW, Goldstein SF (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The Spirochetes. *Annu Rev Genet* 36: 47-73.
31. Goldstein SF, Buttle KF, Charon NW (1996) Structural analysis of the Leptospiraceae and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *J Bacteriol* 178: 6539-6545.
32. Haake DA, Matsunaga J (2010) *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol Microbiol* [Epub ahead of print].
33. Murray GL, Srikrum A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermiswan RW, et al. (2010) Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*: no-no.
34. Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.
35. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, et al. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2: 346-352.
36. Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, et al. (2004) A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. *J Biol Chem* 279: 25420-25429.
37. Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, et al. (2005) Differential TLR recognition of leptospiral Lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* 175: 6022-6031.
38. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, et al. (2008) Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3: e1607.
39. Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, et al. (2000) Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene* 254: 19-28.
40. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL (2011) Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Vet Microbiol* 153: 73-81.
41. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, et al. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol* 175: 4225-4234.

42. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, et al. (2000) The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68: 2276-2285.
43. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, et al. (2004) Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 186: 2818-2828.
44. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, et al. (2003) Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 49: 929-945.
45. Ristow P, Bourhy P, McBride FvWdC, Figueira CP, Huerre M, et al. (2007) The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* 3: e97.
46. Shang ES, Summers TA, Haake DA (1996) Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 64: 2322-2330.
47. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, et al. (2001) Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 39: 3303-3310.
48. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, et al. (2001) Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 69: 4958-4968.
49. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J, et al. (2008) Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 699-708.
50. Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Micro* 7: 736-747.
51. Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, et al. (2010) Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e612.
52. Organisation Mondiale de la Santé (1956) Diagnostic de la leptospirose et typage des leptospires. Genève: Organisation Mondiale de la Santé. 13 p.
53. Adler B, de la Peña Moctezuma A (2010) *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-296.

54. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, et al. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics Int J Syst Bacteriol 37: 463-464.
55. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, et al. (1999) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int J Syst Evol Microbiol 49: 839-858.
56. Cerqueira GM, Picardeau M (2009) A century of *Leptospira* strain typing. Infect Genet Evol 9: 760-768.
57. Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, et al. (2009) *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. Int J Syst Evol Microbiol 59: 705-708.
58. Feresu SB, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1999) DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. Int J Syst Bacteriol 49: 1111--1117.
59. Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M (2006) Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. J Clin Microbiol 44: 3954-3962.
60. Slack A, Dohnt M, Symonds M, Smythe L (2005) Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from far North Queensland, Australia. Ann Clin Microbiol Antimicrob 4: 10.
61. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, et al. (2005) Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. J Clin Microbiol 43: 539-545.
62. Ahmed N, Devi SM, de los A Valverde M, Vijayachari P, Machang'u R, et al. (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol Antimicrob 5: 28.
63. Leon A, Pronost S, Fortier G, Andre-Fontaine G, Leclercq R (2010) Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. J Clin Microbiol 48: 581-585.
64. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, et al. (2007) A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl Trop Dis 1: e56.
65. van Mansfeld R, Jongerden I, Bootsma M, Buiting A, Bonten M, et al. (2010) The population genetics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity. PLoS ONE 5: e13482.

66. Gorgé O, Lopez S, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse V, et al. (2008) Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing *Shigella* spp. J Clin Microbiol 46: 1026-1036.
67. Ren S-X, Fu G, Jiang X-G, Zeng R, Miao Y-G, et al. (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature 422: 888-893.
68. Nascimento ALTO, Verjovski-Almeida S, van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LEA, et al. (2004) Genome features of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. Braz J Med Biol Res 37: 459-478.
69. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, et al. (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. PNAS 103: 14560-14565.
70. Bourhy P, Frangeul L, Couvé E, Glaser P, Saint-Girons I, et al. (2005) Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. J Bacteriol 187: 3931-3940.
71. Saint Girons I, Margarita D, Amouriaux P, Baranton G (1990) First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. Res Microbiol 141: 1131-1138.
72. Xue F, Yan J, Picardeau M (2009) Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. Microbes Infect 11: 328-333.
73. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, et al. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 3: 757--771.
74. Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, et al. (2010) Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). PLoS Negl Trop Dis 4: e724.
75. Moutou F (1980) Enquête sur la faune murine dans le département de la Réunion. Rapport DDASS. 131 p.
76. Debarbat F, Mollaret, H.H., Mailloux, M. (1983) Leptospiroses in the island of Reunion. II. Animal leptospiroses [in French]. Bull Soc Pathol Exot 76: 736-743.
77. Gares H (2003) Study of infertility risk factors in Reunion island dairy herds [in French]. Toulouse: Université Paul Sabatier. 103 p.
78. Sigaud M, Caceres S, Picard M, Desvars A, Michault A (2009) Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*): natural maintenance host of leptospires? [in French]. Bull Soc Pathol Exot 102: 19-20.

79. Charton A (1992) Contribution à l'étude épidémiologique des leptospiroses. Le cas de l'île de Mayotte. Lyon: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. 101 p.
80. Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, et al. (2005) Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. Clin Infect Dis 40: 343-351.
81. Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes MML, Linhares AAC, et al. (2002) Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia [in Portuguese]. Rev Soc Bras Med Trop 35: 159-165.
82. Bal AM, Bharadwaj RS, Gita N, Joshi SA, Thakare JP (2003) Guillain-Barre syndrome in a pediatric patient following infection due to *Leptospira*. Jpn J Infect Dis 56: 29-31.
83. Panicker JN, Mammachan R, Jayakumar RV (2001) Primary neuroleptospirosis. Postgrad Med J 77: 589-590.
84. Sanjeev J, Mohd Khateebullah A (2010) Leptospirosis presenting as acute meningoencephalitis. Journal of Infection in Developing Countries 4: 179-182.
85. Marchiori E, Lourenço S, Setubal S, Zanetti G, Davaus Gasparetto T, et al. (2011) Clinical and imaging manifestations of hemorrhagic pulmonary leptospirosis: a state-of-the-art review. Lung 189: 1-9.
86. Turner LH (1969) Leptospirosis. Br Med J 1: 231-235.
87. Levett PN, Haake DA (2009) *Leptospira* species (Leptospirosis). In: Gerald L, Mandell, J.E.B., Raphael, D. , editor. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases 7th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.
88. Renault P, Boidin E, D'Ortenzio E, Balleydier E, Daniel B, et al. (2010) Epidemiological surveillance of leptospirosis on Reunion Island in 2004-2008: possible impact of chikungunya infection on the case fatality rate of leptospirosis [in French]. Bulletin de Veille Sanitaire 104: 148-152.
89. Silva Júnior GB, Abreu KL, Mota RMB, A.G., Araújo SM, Rocha HA, et al. (2011) RIFLE and Acute Kidney Injury Network classifications predict mortality in leptospirosis-associated acute kidney injury. Nephrology (Carlton) 16: 269-276.
90. Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WDJ, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet 354: 820-825.
91. Sarkar U, Nascimento S, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, et al. (2002) Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am J Trop Med Hyg 66: 605--610.

92. Abdulkader RCRM, Silva MV (2008) The kidney in leptospirosis. *Pediatr Nephrol* DOI 10.1007/s00467-008-0811-4.
93. Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, et al. (1998) Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhagiae - Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178: 1457-1463.
94. Park SK, Lee SH, Rhee YK, Kang SK, Kim KJ, et al. (1989) Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. *Am J Trop Med Hyg* 41: 345-351.
95. Daher EF, Lima RSA, Silva Junior GB, Silva EC, Karbage NNN, et al. (2010) Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. *Braz J Infect Dis* 14: 3-10.
96. Zavala-Velazquez J, Cardenas-Marrufo M, Vado-Sois I, Cetina-Camara M, Cano-Tur J, et al. (2008) Hemorrhagic pulmonary leptospirosis: three cases from the Yucatan peninsula, Mexico. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 404-408.
97. Ahmad S, Sarwari AR (2010) Leptospirosis induced pulmonary alveolar hemorrhage. *W V Med J* 106: 20-22.
98. Im JG, Yeon KM, Han MC, Kim CW, Webb WR, et al. (1989) Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. *Am J Roentgenol* 152: 955-959.
99. Paganin F, Bourdin A, Borgherini G, Dalban C, Poubeau P, et al. (2009) Manifestations pulmonaires de la leptospirose. *Rev Mal Respir* 26: 971-979.
100. Nally JE, Chantranuwat C, Wu X-Y, Fishbein MC, Pereira MM, et al. (2004) Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol* 164: 1115-1127.
101. Medeiros FdR, Spichler A, Athanazio DA (2010) Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop* 115: 155-162.
102. Croda J, Neto AN, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, et al. (2010) Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect* 16: 593-599.
103. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CRR (2007) Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz J Infect Dis* 11: 142-148.
104. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho LAF, Aires T, S.F., Villasboas-Bisneto JC, et al. (2008) Leptospirosis associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 505-508.

105. Herrmann-Storck C, Saint Louis M, Foucand T, Lamaury I, Deloumeaux J, et al. (2010) Severe leptospirosis in hospitalized patients, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis* 16: 331-334.
106. Paganin F, Bourdin A, Dalban C, Courtin JP, Poubeau P, et al. (2007) Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): analysis of factors associated with severity in 147 confirmed cases. *Intensive Care Med* 33: 1959-1966.
107. Marotto PC, Ko AI, Murta-Nascimento C, Seguro AC, Prado RR, et al. (2010) Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *J Infect* 60: 218-223.
108. Marotto Paulo CF, Nascimento Cristiane MR, Eluf-Neto J, Marotto Marcia S, Andrade L, et al. (1999) Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 29: 1561-1563.
109. Rathinam S (2005) Ocular manifestations of leptospirosis. *J Postgrad Med* 51: 189-194.
110. Curling A (2011) Equine recurrent uveitis: classification, etiology, and pathogenesis. *Compendium of Continuing Education for Veterinarians* 33: E1-4.
111. Verma A, Kumar P, Babb K, Timoney JF, Stevenson B (2010) Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e778.
112. Wagenaar JFP, Goris MGA, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu ATA, et al. (2007) What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Trop Med Int Health* 12: 111-122.
113. Edwards CN, Nicholson GD, Hassel TA, Everard CO, Callender J (1986) Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *Am J Trop Med Hyg* 35: 352-354.
114. Nicodemo AC, Del Negro G, Amato Neto V (1990) Thrombocytopenia and leptospirosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 32: 252-259.
115. Yang H-L, Jiang X-C, Zhang X-Y, Li W-J, Hu B-Y, et al. (2006) Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. *BMC Infect Dis* 6: 19.
116. Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, et al. (2008) Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis* 46: 254-260.
117. Wagenaar JFP, Goris MGA, Partiningrum DL, Isbandrio B, Hartskeerl RA, et al. (2010) Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Trop Med Int Health* 15: 152-159.

118. Law-Koune JD, Picard P, Van Der Linden T, Michault A, Corbin JC, et al. (1988) Thrombocytopenia in leptospirosis. Role of anti-platelet antibodies [in French]. *Presse Med* 17: 1315-1316.
119. McClure EM, Goldenberg R, L. (2009) Infection and stillbirth. *Semin Fetal Neonatal Med* 14: 182-189.
120. McGovern LM, Boyce TG, Fischer PR (2007) Congenital infections associated with international travel during pregnancy. *J Travel Med* 14: 117-128.
121. Tramonì G, Clément HJ, Lopez F, Viale JP (2003) An unusual case of post partum haemorrhage: leptospirosis infection [in French]. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 22: 363-365.
122. Goldenberg R, L., McClure EM, Saleem S, Reddy UM (2010) Infection-related stillbirths. *Lancet* 375: 1482-1490.
123. Carles G, Montoya E, Joly F, Peneau C (1995) Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana [in French]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 24: 418-421.
124. Baytur YB, Cabuk M, Koyuncu FM, Lacin S, Ceylan C, et al. (2005) Weil's syndrome in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 119: 132-133.
125. Shaked Y, Shpilberg O, Samra D, Samra Y (1993) Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clin Infect Dis* 17: 241-243.
126. Chedraui PA, San Miguel G (2003) A case of leptospirosis and pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 269: 53-54.
127. Dassanayake D, Wimalaratna H, Agampodi S, Liyanapathirana V, Piya Rathna T, et al. (2009) Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis* 9: 48.
128. McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376--386.
129. Srinivas R, Agarwal R, Gupta D (2007) Severe sepsis due to severe falciparum malaria and leptospirosis co-infection treated with activated protein C. *Malar J* 6: 42.
130. Spichler A, Moock M, Chapola EG, Vinetz J (2005) Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. *Braz J Infect Dis* 9: 336-340.

131. Silva JJPd, Dalston MO, Carvalho JEMd, Setubal S, Oliveira JMCd, et al. (2002) Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 395-399.
132. Blenden DC, Goldberg HS (1965) Silver impregnation stain for *Leptospira* and flagella. *J Bacteriol* 89: 899-900.
133. Sharma KK, Kalawat U (2008) Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: one-year prospective study. *Indian J Pathol Microbiol* 51: 209-211.
134. Picardeau M, Cornet M, Morel V, Sertour N, Chaumet D, et al. (2008) Impact of the revised diagnostic policy on the diagnosis and surveillance of leptospirosis in France [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 37: 329-331.
135. World Health Organization (2003) Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World health Organization. 122 p.
136. Maciel EAP, de Carvalho ALF, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, et al. (2008) Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e154.
137. Kazami A, Watanabe H, Hayashi T, Kobayashi K, Ogawa Y, et al. (2002) Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. *J Vet Med Sci* 64: 735-737.
138. Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, et al. (2009) Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 87: 16-19.
139. Tucunduva de Faria M, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, et al. (2008) Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 108: 1-5.
140. Kuriakose M, Regi P, Joseph MR, Sugathan S, Sudha TN (2008) Leptospirosis in a midland rural area of Kerala state. *Indian J Med Res* 128: 307-312.
141. Gautam R, Guptill LF, Wu CC, Potter A, Moore GE (2010) Spatial and spatio-temporal clustering of overall and serovar-specific *Leptospira* microscopic agglutination test (MAT) seropositivity among dogs in the United States from 2000 through 2007. *Prev Vet Med* 96: 122-131.
142. Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, et al. (2010) Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: 375-387.

143. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, et al. (2011) Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 289-297.
144. Bomfim MRQ, Ko A, Koury MC (2005) Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol* 109: 89-94.
145. Mérien F, Amouriaux P, Pérolat P, Baranton G, Saint-Girons I (1992) Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical sample. *J Clin Microbiol* 30: 2219-2224.
146. Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, et al. (2011) Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study. *PLoS ONE* 6: e16236.
147. Zuerner RL, Alt DP, Bolin CA (1995) IS1533-based assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *J Clin Microbiol* 33: 3284-3289.
148. Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, et al. (2005) Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hap1* encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 243: 437-445.
149. Levett PN, Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W. (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54: 45-59.
150. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR (2009) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 247--255.
151. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA (2009) Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS ONE* 4: e7093.
152. Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A, Phulsuksombati D, Tantitanawat S, et al. (2007) Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57: 117-122.
153. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Athaud A, et al. (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139-147.
154. Mohan ARM, Cumberbatch A, Adesiyun AA, Chadee DD (2009) Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996-2007: A retrospective study. *Acta Trop* 112: 260-265.

155. Holt J, Davis S, Leirs H (2006) A model of leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Trop* 99: 218-225.
156. Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, et al. (2011) Seasonality of human leptospirosis in Reunion island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. *PLoS ONE* 6: e20377.
157. Coelho M, Massad E (2011) The impact of climate on Leptospirosis in São Paulo, Brazil. *Int J Biometeorol* [Epub ahead of print]: 1-9.
158. Herrmann-Storck C, Brioude A, Quirin R, Deloumeaux J, Lamaury I, et al. (2005) Retrospective review of leptospirosis in Guadeloupe, French West Indies 1994-2001. *West Indian Med J* 54: 42-46.
159. Sundharagati B, Boonpacknavig S, Harinasuta C, Pholpothi T (1966) Seasonal incidence of canine leptospirosis in Bangkok. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60: 366-368.
160. Chou YL, Chen CS, Liu CC (2008) Leptospirosis in Taiwan, 2001-2006. *Emerg Infect Dis* 14: 856-857.
161. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, et al. (2008) Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int Health* 13: 503-512.
162. Watson JT, Gayer M, Connolly MA (2007) Epidemics after natural disasters. *Emerg Infect Dis* 13: 1-5.
163. Bharadwaj R, Bal AM, Joshi SA, Kagal A, Pol SS, et al. (2002) An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *Jpn J Infect Dis* 55: 194-196.
164. Maskey M, Shastri JS, Saraswathi K, Surpam R, Vaidya N (2006) Leptospirosis in Mumbai: post-deluge outbreak 2005. *Indian J Med Microbiol* 24: 337-338.
165. Pappachan MJ, Sheela M, Aravindan KP (2004) Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. *J Epidemiol Community Health* 58: 1054-1055.
166. Kawaguchi L, Sengkeoprasedh B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, et al. (2008) Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg* 78: 957-961.
167. Victoriano ABF, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, et al. (2009) Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis* 9: doi:10.1186/1471-2334-1189-1147.

168. Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, et al. (2000) Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Eur J Epidemiol* 16: 79-86.
169. Barcellos C, Sabroza PC (2001) The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica* 17(supplemento).
170. Sanders EJ, Rigau-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, et al. (1999) Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am J Trop Med Hyg* 61: 399-404.
171. Gaynor K, Katz AR, Park SY, Nakata M, Clark TA, et al. (2007) Leptospirosis on Oahu: an outbreak associated with flooding of a university campus. *Am J Trop Med Hyg* 76: 882-886.
172. Goarant C, Laumont-Barney S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, et al. (2009) Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health* 14: 1-4.
173. Baranton G, Postic D. (2006) Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int J Infect Dis* 10: 162-170.
174. Kupek E, de Sousa Santos Faversoni MC, de Souza Philippi JM (2000) The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. *Braz J Infect Dis* 4: 131-134.
175. Coudert C, Beau F, Berlioz-Arthaud A, Melix G, Devaud F, et al. (2007) Human leptospirosis in French Polynesia. Epidemiological, clinical and bacteriological features. *Med Trop* 67: 137-144.
176. Hermann Storck C, Postic D, Lamaury I, Perez JM (2008) Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Nino southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect* 136: 1407-1415.
177. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, et al. (2008) Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop* 107: 255-258.
178. International Society for Infectious Diseases (2009) ProMED-mail post. PRO/AH/EDR> Leptospirosis - Philippines (03).
179. Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN (1997) Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis* 3: 78-80.

180. Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, et al. (2011) Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. Curr Microbiol [Epub ahead of print].
181. Dias JP, Teixeira MG, Nascimento Costa MC, Mendes CMC, Guimaraes P, et al. (2007) Factors associated with *Leptospira sp* infection in a large urban center in northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 40: 499-504.
182. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, et al. (2006) Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. PLoS Med 3: e308. DOI: 310.1371/journal.pmed.0030308.
183. Riley L, Ko A, Unger A, Reis M (2007) Slum health: Diseases of neglected populations. BMC International Health and Human Right 7: 2.
184. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, et al. (2008) Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis 2: e228.
185. Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Roy S, Manickam P, et al. (2009) Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. Indian J Med Res 130: 67-73.
186. Sharma S, Vijayachari P, Sugunan AP, Natarajaseenivasan K, Sehgal SC (2006) Seroprevalence of leptospirosis among high-risk population of Andaman islands, India. Am J Trop Med Hyg 74: 278-283.
187. Waitkins SA (1986) Leptospirosis as an occupational diseases. Br J Ind Med 43: 721-725.
188. Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM (2002) Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases. Am J Trop Med Hyg 66: 61-70.
189. Demers R, Y., Frank R, Demers P, Clay M (1985) Leptospiral exposure in Detroit rodent control workers. Am J Public Health 75: 1090-1091.
190. Natarajaseenivasan K, Boopalan M, Selvanayagi K, Suresh SR, TRatnam S (2002) Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. Jpn J Infect Dis 55: 170-173.
191. Zamora J, Riedemann S, Montecinos MI, Cabezas X (1990) Serological survey of human leptospirosis in a high risk population in Chile. Rev Med Chil 118: 247-252.

192. Everard CO, Hayes RJ, Fraser-Chanpong GM (1985) A serosurvey for leptospirosis in Trinidad among urban and rural dwellers and persons occupationally at risk. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 96-105.
193. Katz AR, Buchholz AE, Hinson K, Park SY, Effler PV (2011) Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999–2008. *Emerg Infect Dis* 17: 221-226.
194. Perrocheau A, Pérolat P (1997) Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *Eur J Epidemiol* 13: 161-167.
195. Topic MB, Habus J, Milas Z, Tosev EC, Stritof Z, et al. (2009) Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* In Press, Corrected Proof.
196. Hirschauer C, Daudens E, Coudert C, Frogier E, Melix G, et al. (2009) Epidemiology of leptospirosis in French Polynesia from 2006 to 2008 [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 48-49-50: 508-511.
197. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2006) The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998–2004. *Epidemiol Infect* 134: 1217-1225.
198. Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M (2006) Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis* 10: 378-386.
199. Morshed MG, Konishi H, Terada Y, Arimitsu Y, Nakazawa T (1994) Seroprevalence of leptospirosis in a rural flood prone district of Bangladesh. *Epidemiol Infect* 112: 527-531.
200. Pereira MMA, J. (1990) Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil - a serological and epidemiological study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 47-52.
201. Duval G, Michault A, Baranton G, Law-Koune JD, Folio G, et al. (1991) Sero epidemiological survey on human leptospirosis in Reunion Island [in French]. *Rev Epidémiol Santé Publique* 39: 135--141.
202. Lévesque B, Messier V, Bonnier-Viger Y, Couillard M, Côté S, et al. (2007) Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 283-286.
203. Abb J (2002) Acute leptospirosis in a triathlete. *Wilderness Environ Med* 13: 45-47.
204. Guarner J, Shieh W-J, Morgan J, Bragg SL, Bajani MD, et al. (2001) Leptospirosis mimicking acute cholecystitis among athletes participating in a triathlon. *Hum Pathol* 32: 750-752.

205. Morgan J, Bornstein Shari L, Karpati Adam M, Bruce M, Bolin CA, et al. (2002) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 34: 1593-1599.
206. Wilkins E, Cope A, Waitkins S (1988) Rapids, rafts, and rats. *The Lancet* 332: 283-284.
207. Gelman S, S. , Gundlapalli A, V. , Hale D, Croft A, Hindiyeh M, et al. (2002) Spotting the Spirochete: rapid diagnosis of leptospirosis in two returned travelers. *J Travel Med* 9: 165-167.
208. Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, et al. (2003) Leptospirosis in “eco-challenge” athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 9: 702-707.
209. Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, et al. (2002) Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis* 34.
210. Teichmann D, Göbels K, Simon J, Grobusch M, P., Suttorp N (2001) A severe case of leptospirosis acquired during an Iron man contest. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 137-138.
211. Hochedez P, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourhy P, et al. (2011) Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. *Am J Trop Med Hyg* 84: 621-626.
212. Stern Eric J, Galloway R, Shadomy Sean V, Wannemuehler K, Atrubin D, et al. (2010) Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida, 2005. *Clin Infect Dis* 50: 843-849.
213. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1997) Outbreak of leptospirosis among white-water rafters--Costa Rica, 1996. *Morb Mortal Wkly Rep* 46: 577-579.
214. Boland M, Sayers G, Coleman T, Bergin C, Sheehan N, et al. (2004) A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. *Epidemiol Infect* 132: 195-200.
215. Mortimer RB (2005) Leptospirosis in a caver returned from Sarawak, Malaysia. *Wilderness Environ Med* 16: 129-131.
216. Lau C, Smythe L, Weinstein P (2010) Leptospirosis: An emerging disease in travellers. *Travel Med Infect Dis* 8: 33-39.
217. Grobusch M, P., Bollmann R, Schönberg A, Slevogt H, Garcia V, et al. (2003) Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic. *J Travel Med* 10: 55-58.

218. Agampodi S, Peacock SJ, Thevanesam V (2009) The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka. *The Lancet Infectious Diseases* 9: 524-526.
219. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN (2008) Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences* 33: 557-569.
220. World Health Organization (2011) Leptospirosis: an emerging public health problem. *Wkly Epidemiol Rec* 86: 45-50.
221. Hartskeerl AR, Collares-Pereira M, Ellis WA (2011) Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501.
222. Evangelista KV, Coburn J (2010) *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 5: 1413-1425.
223. Bolin CA (1996) Diagnostic of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg* 11: 166-171.
224. Meites E, Jay MT, Deresinski S, Shieh WJ, Zaki SR, et al. (2004) Reemerging leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis* 10: 406-412.
225. Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, et al. (2009) Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis* 48: 691-697.
226. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, et al. (2010) 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 25: 1--13.
227. Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, et al. (2002) Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 8: 1004-1005.
228. Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, et al. (2011) Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *J Clin Microbiol* [Epub ahead of print].
229. Esmaeili R, Hesamzadeh A, Alizadeh-Navaei R, Haghshenas MH, Alhani F (2009) Incidence of leptospirosis in Mazandaran Province, north of Iran: a one year survey. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 1330-1333.
230. Tangkanakul W, Tharmaphornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, et al. (2000) Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 63: 204-206.

231. Vado-Solis I, Cardenas-Marrufo MF, Jimenez-Delgadillo B, Alzina-Lopez A, Laviada-Molina H, et al. (2002) Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44: 335-340.
232. Narita M, Fujitani S, Haake DA, Paterson DL (2005) Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama islands, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 73: 652-656.
233. Young CC, Niedfeldt MW, Gottschich LM, Peterson CS, Gammons MR (2007) Infectious disease and the extreme sport athlete. *Clin Sports Med* 26: 473-487.
234. Olszyna DP, Jaspars R, Speelman P, van Elzakker E, Korver H, et al. (1998) Leptospirosis in the Netherlands, 1991-1995 [in Dutch]. *Ned Tijdschr Geneesk* 142: 1270-1273.
235. Christova I, Tasseva E, Manev H (2003) Human leptospirosis in Bulgaria, 1989-2001: epidemiological, clinical, and serological features. *Scand J Infect Dis* 35: 869-872.
236. Johnston V, Stockley JM, Dockrell D, Warrell D, Bailey R, et al. (2009) Fever in returned travellers presenting in the United Kingdom: Recommendations for investigation and initial management. *J Infect* 59: 1-18.
237. Leshem E, Segal G, Barnea A, Yitzhaki S, Ostfeld I, et al. (2010) Travel-related leptospirosis in Israel: a nationwide study. *Am J Trop Med Hyg* 82: 459-463.
238. Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, et al. (2005) Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis* 11: 1048-1054.
239. Askling HH, Lesko B, Vene S, Berndtson A, Björkman P, et al. (2009) Serologic analysis of returned travelers with fever, Sweden. *Emerg Infect Dis* 15: 1805-1808.
240. Bezirtzoglou C, Dekas K, Charvalos E (2011) Climate changes, environment and infection: Facts, scenarios and growing awareness from the public health community within Europe. *Anaerobe In Press*, Uncorrected Proof.
241. Epstein PR (1999) Climate and health. *Science* 285: 347-348.
242. Patz JA, Kovats RS (2002) Hotspots in climate change and human health. *Br Med J* 325: 1094-1098.
243. Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P (2002) Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. *Natl Med J India* 15: 22-23.
244. Lau C (2010) Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 631-638.

245. Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA (2005) Impact of regional climate change on human health. *Nature* 438: 310-317.
246. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, et al. (2007) Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 357: 1018-1027.
247. Programme UNHS (2003) The challenge of slums: global report on human settlements 2003. London, UK. 310 p.
248. Yanagihara Y, Villanueva SYAM, Yoshida S-i, Okamoto Y, Masuzawa T (2007) Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30: 399-413.
249. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, et al. (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647-652.
250. Suzan G, Marcé E, Giermakowski JT, Mills JN, Ceballos G, et al. (2009) Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS ONE* 4: e5461.
251. Swaddle J, Calos P (2008) Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS ONE* 3: e2488.
252. Allan BF, Keesing F, Ostfeld R (2003) Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conserv Biol* 17: 267-272.
253. Carver S, Spafford H, Storey A, Weinstein P (2009) Dryland salinity and the ecology of Ross River virus: the ecological underpinnings of the potential for transmission. *Vect Borne Zoo Dis* 9: 611-622.
254. Carlson JC, Dyer LA, Omlin FX, Beier JC (2009) Diversity cascades and malaria vectors. *J Med Entomol* 46: 460-464.
255. Derne BT, Fearnley EJ, Lau CL, Paynter S, Weinstein P (2011) Biodiversity and leptospirosis risk: A case of pathogen regulation? *Med Hypotheses* In Press, Corrected Proof.
256. Howald G, Donlan CJ, Galvan JP, Russell JC, Parkes J, et al. (2007) Invasive rodent eradication on islands. *Conserv Biol* 21: 1258-1268.
257. Lhomme V, Grolier-Bois L, Jouannelle J, Elisabeth L (1996) Leptospirosis in Martinique from 1987 to 1992: results of an epidemiological, clinical and biological study. *Med Mal Infect* 26: 94-98.

258. Berlioz-Arthaud A, Kiedrzyński T, Singh N, Yvon J-F, Roualen G, et al. (2007) Multicentre survey of incidence and public health impact of leptospirosis in the Western Pacific. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 714-721.
259. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2001) Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop* 78: 103-116.
260. Maillard J-C, Gonzalez J-P (2006) Biodiversity and emerging diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 1-16.
261. Higgins R (2004) Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 23: 569-581.
262. Prescott JF, McEwen B, Taylor J, Woods JP, Abrams-Ogg A, et al. (2002) Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. *Can Vet J* 43: 955-961.
263. Ghneim G, S., Viers J, H., Chomel B, B., Kass P, H., Descollonges D, A., et al. (2007) Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Vet Res* 38: 37-50.
264. Ward MP, Guptill LF, Prah A, Wu CC (2004) Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc* 224: 1958-1963.
265. Ward MP (2002) Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United States and Canada. *Prev Vet Med* 56: 215-226.
266. Ward MP, Glickman LT, Guptill LE (2002) Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J Am Vet Med Assoc* 220: 53-58.
267. Ward MP (2002) Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev Vet Med* 56: 203-213.
268. Prescott JF, Key D, Osuch MR (1999) Leptospirosis in dogs. *Can Vet J* 40: 430-431.
269. Klopffleisch R, Kohn B, Plog S, Weingart C, Nöckler K, et al. (2010) An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? *Veterinary Medicine International*: 928541.
270. Jansen A, Nöckler K, Schönberg A, Luge E, Ehlert D, et al. (2006) Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 544-546.

271. Richardson DJ, Gauthier, J.L. (2003) A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. *Vect Borne Zoo Dis* 3: 187-193.
272. Ward MP, Guptill LF, Wu CC (2004) Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc* 225: 72-77.
273. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
274. Ashford RW (2003) When is a reservoir not a reservoir? *Emerg Infect Dis* 9: 1495-1496.
275. Savey M, Dufour B (2004) Diversité des zoonoses. Définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. *Epidemiologie et Santé Animale* 46: 1-16.
276. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE (2009) Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol* 46: 792-799.
277. Minette HP (1961) Incidence and serotype of *Leptospirae* isolated from rodents and mongooses on the island of Hawaii. 10th Pacific Sci Congr. Honolulu.
278. Minette HP (1964) Leptospirosis in rodents and mongooses on the Island of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg* 13: 826-832.
279. Tomich PQ (1979) Studies of leptospirosis in natural host populations I. Small mammals of Waipio Valley, island of Hawaii. *Pacific Science* 33: 257-279.
280. Higa HH, Fujinaka IT (1976) Prevalence of rodent and mongoose leptospirosis on the island of Oahu. *Public Health Rep* 91: 171-177.
281. Alexander AD, Benenson A, Byrne RJ, Diaz Rivera RS, Evans LB, et al. (1963) Leptospirosis in Puerto Rico. *Zoonoses Res* 2: 152-227.
282. Michel V (2001) *Epidémiologie de la leptospirose zoonose: étude comparée du rôle de différentes espèces de la faune sauvage et de leur environnement*. Lyon: Université Claude Bernard. 251 p.
283. Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G (2002) Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* 54: 7-10.
284. Everard CO, Fraser-Chanpong GM, Bhagwandin LJ, Race MW, James AC (1983) *Leptospirae* in wildlife from Trinidad and Grenada. *J Wildl Dis* 19: 192-199.
285. Everard COR, Green AE (1976) Leptospirosis in Trinidad and Grenada, with special reference to the mongoose. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 57-61.

286. Vinetz JM, Wilcock BA, Aguirre A, Gollin LX, Katz AR, et al. (2005) Beyond disciplinary boundaries: leptospirosis as a model of incorporating transdisciplinary approaches to understand infectious disease emergence. *EcoHealth* 2: 291-306.
287. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA (2005) Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun* 73: 3251-3260.
288. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, et al. (2008) Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e213.
289. Ralaiarijaona RL, Bellenger E, Chanteau S, Roger F, Pérolat P, et al. (2001) Recherche de réservoirs de la leptospirose à Madagascar par la technique d'amplification génique. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 67: 34-36.
290. Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Duarte-Rodrigues P (2000) Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *Eur J Epidemiol* 16: 1151-1157.
291. Sunbul M, Esen S, Leblebicioglu H, Hokelek M, Pekbay A, et al. (2001) *Rattus norvegicus* acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand J Infect Dis* 33: 896--898.
292. Villanueva SYAM, Ezoe H, Baterna RA, Yanagihara Y, Muto M, et al. (2010) Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 82: 889--898.
293. Maghami GH, Hooshmand-rad P, Farhang-azad A (1977) Leptospirosis in small mammals of Iran: II: isolation of *Leptospira grippotyphosa* from *Mus musculus*. *J Wildl Dis* 13: 286-289.
294. Brown RZ, Gorman GW (1960) The occurrence of leptospiral infections in feral rodents in southwestern Georgia. *Am J Public Health* 50: 175-181.
295. Cvetnic Z, Margaletic JM, Tonicic J, Turk N, Milas Z, et al. (2003) A serological survey and isolation of leptospires from small rodents and wild boars in the Republic of Croatia. *Vet Med* 48: 321-329.
296. Mgone GF, Mhamphi G, Katakweba A, Paemelaere E, Willekens N, et al. (2005) PCR detection of *Leptospira* DNA in rodents and insectivores from Tanzania. *Belg J Zool* 135: 17-19.
297. Matthias MA, Levett PN (2002) Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Med J* 51: 10-13.

298. World Health Organization (1986) Leptospirosis. The coypu as a rodent reservoir infection. Wkly Epidemiol Rec 15: 115.
299. Waitkins SA, Wanyangu S, Palmer M (1985) The coypu as a rodent reservoir of leptospira infection in Great Britain. J Hygiene (Cambridge) 95: 409-417.
300. Michel V, Ruvoen-Clouet N, Menard A, Sonrier C, Fillonneau C, et al. (2001) Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and human in France. Eur J Epidemiol 17: 111-121.
301. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, et al. (2009) Leptospira exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 32: 463-476.
302. Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, VanderSchalie J, Besser TE, et al. (2008) Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington state. Zoonoses and Public Health 55: 436-442.
303. Gale JL, Head MD (1970) *Suncus* as a potential reservoir of leptospirosis: the blaming of the shrew. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1: 270-274.
304. Kundin WD, Carlos ER, Tsai CC, Kueczynski GA (1970) *Suncus* as a potential reservoir of leptospirosis: the blaming of the shrew. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1: 270-274.
305. Tsai CC, Fresh JW (1971) *Leptospira* in the *Hebdomadis* and *Pomona* serogroups from mongooses in Taiwan. Trop Geogr Med 23: 201-203.
306. Barcellos C, Lammerhirt CB, de Almeida MAB, dos Santos E (2003) Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. Cad Saude Publica 19: 1283-1292.
307. Davis S, Calvet E, Leirs H (2005) Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses. Vect Borne Zoo Dis 5: 305-314.
308. Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, et al. (2005) Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. Rev Soc Bras Med Trop 38: 294--300.
309. Yasuda PH, Santa Rosa CA, Myers DM, Yanaquita RM (1980) The isolation of leptospira from stray dogs in the city of Sao Paulo, Brazil. Int J Zoonoses 7: 131-134.
310. Tsai CC, Fresh JW (1969) *Leptospira canicola* isolated from dogs in Taiwan. J Formos Med Assoc 68: 58-62.

311. André-Fontaine G (2006) Canine leptospirosis-Do we have a problem? *Vet Microbiol* 117: 19-24.
312. Moore GE, Guptill LF, Glickman NW, Caldanaro RJ, Aucoin D, et al. (2006) Canine leptospirosis, United States, 2002-2004. *Emerg Infect Dis* 12: 501-503.
313. Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, et al. (2009) Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Veterinary Medical Science* 71: 1191-1199.
314. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, et al. (2010) Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Epub ahead of print].
315. Meeyam T, Tablerk P, Petchanok B, Pichpol D, Padungtod P (2006) Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis in dogs. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37: 148-153.
316. Rossetti CA, Liem M, Samartino LE, Hartskeerl RA (2005) Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. *Vet Microbiol* 107: 241-248.
317. Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA (2010) Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiol Infect* 138: 1059-1070
318. Romero MH, Sanchez JA, Hayek LC (2010) Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en poblacion urbana humana y canina del Departamento del Tolima. *Rev Salud Pública* 12: 268-275.
319. Brown K, Prescott J (2008) Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *Can Med Assoc J* 178: 399-401.
320. Juvet F, Schuller S, O'Neill EJ, O'Neill PA, Nally JE (2011) Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Vet Rec* [Epub ahead of print].
321. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM (2003) Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1230-1233.
322. Jorge RSP, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Vasconcellos SdA, Lima EdS, et al. (2011) Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 441-444.

323. Levett PN (2003) Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clin Infect Dis 36: 447--452.
324. Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, et al. (2009) The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. Am J Trop Med Hyg 81: 695--697.
325. Thiermann AB (1981) The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. J Wildl Dis 17: 39-43.
326. Tulsiani SM, Graham GC, Dohnt MF, Burns M-A, Craig SB (2011) Maximizing the chances of detecting pathogenic leptospires in mammals: the evaluation of field samples and a multi-sample-per-mammal, multi-test approach. Ann Trop Med Parasitol 105: 145-162.
327. Thiermann AB (1977) Incidence of leptospirosis in the Detroit rat population. Am J Trop Med Hyg 26: 970-974.
328. de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, et al. (2008) Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta Trop 108: 1--5.
329. Abdulkader RCRM, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, Da Silva MV (2002) Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. Rev Inst Med Trop S Paulo 44: 79-83.
330. Prescott J (2008) Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. Can Med Assoc J 178: 397-398.
331. Andrade L, Rodrigues AC, Sanches TRC, Souza RB, Seguro AC (2007) Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. Am J Physiol Renal Physiol 292.
332. Claus A, Van de Maele I, Pasmans F, Gommeren K, Daminet S (2008) Leptospirosis in dogs: a retrospective study of seven clinical cases in Belgium. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 77: 259-263.
333. Kohn B, Steinicke K, Arndt G, Gruber AD, Guerra B, et al. (2010) Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. J Vet Intern Med [Epub ahead of print].
334. Ellis WA (2010) Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? Vet Rec 167: 602-605.
335. Goldstein RE (2010) Canine leptospirosis. The Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice 40: 1091-1101.

336. Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi A-A, et al. (2010) *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect Genet Evol* 10: 273-277.
337. Silva EF, Cerqueira, G.M., Seyffert, N., Hartwig, D.D., Athanazio, D.A., Pinto, L.S., Queiroz, A., Ko, A.I., Brod, C.S., Dellagostin, O.A. (2009) *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15.
338. Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF, Gutiérrez-Blanco E, Jiménez-Coello M (2008) Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with *Leptospira* species. *Ann N Y Acad Sci* 1149: 270-274.
339. Hrinivich K, Prescott JF (1997) Leptospirosis in 2 unrelated dogs. *Can Vet J* 38: 509-510.
340. Roach JM, van Vuuren M, Picard JA (2010) A serological survey of antibodies to *Leptospira* species in dogs in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 81: 156-159.
341. Klaasen HLB, Molkenboer MJCH, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ (2003) Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 95: 121-132.
342. Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH (1992) Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med* 6: 235-244.
343. Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, et al. (1998) Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract* 39: 231-236.
344. Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, Ojkic D, Presvott JF (2009) Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. *Can J Vet Res* 73: 167-175.
345. Geisen V, Stengel C, Brem S, Müller W, Greene C, et al. (2007) Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract* 48: 324-328.
346. Bakoss P, Jarekova J, Labuda M (2007) An attempt to control a natural focus of leptospirosis grippotyphosa by rodenticide - a long-term study (1977-2004). *Ann Agric Environ Med* 14: 51-56.
347. Scanziani E, Origgi F, Giusti AM, Iacchia G, Vasino A, et al. (2002) Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. *J Small Anim Pract* 43: 154-157.
348. Hartman EG, van Houten M, Frik JF, van der Donk JA (1984) Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet Immunol Immunopathol* 7: 245-254.

349. Tronel JP, Bey RF, Thevenon J, Minke J, Milford F (1999) Efficacy of Leptodog® vaccine in dogs demonstrated by experimental challenges: evaluation at short term and duration of immunity. Proceedings of the 24th World Small Animal Veterinary Congress. Lyon, France.
350. Minke JM, Bey R, Tronel JP, Latour S, Colombet G, et al. (2009) Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol* 137: 137-145.
351. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, et al. (2005) Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet Microbiol* 108: 113-118.
352. Carlos ER, Kundin WD, Watten RH, Tsai CC, Irving GS, et al. (1971) Leptospirosis in the Philippines: feline studies. *Am J Vet Res* 32: 455-456.
353. Jamshidi S, Akhavizadegan MA, Bokaie S, Maazi N, A. GA (2009) Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 1: 32-36.
354. Felt SA, Wasfy MO, El-Tras WF, Samir A, Rahaman BA, et al. (2011) Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla city, Gharbeya Governorate, Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 84: 420-425.
355. Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, Birgel EH, Fernandes WR, et al. (1985) Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *Int J Zoonoses* 12: 111-119.
356. Agunloye CA, Nash AS (1996) Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J Small Anim Pract* 37: 126-129.
357. Fukushima H, Nakamura R, Iitsuka S, Ito Y, Saito K (1985) Presence of zoonotic pathogens (*Yersinia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Leptospira* spp.) simultaneously in dogs and cats. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 181: 430-440.
358. Donahue JM, Smith BJ, Poonacha KB, Donahoe JK, Rigsby CL (1995) Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons. *J Vet Diagn Invest* 7: 87-91.
359. Houwers DJ, Goris MGA, Abdoel T, Kas JA, Knobbe SS, et al. (2010) Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. *Vet Microbiol* 148: 449-451.
360. Shanahan LM, Slovis NM (2011) *Leptospira interrogans* associated with hydrallantois in 2 pluriparous thoroughbred mares. *J Vet Intern Med* 25: 158-161.

361. Baverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzen P, Egenvall A (2009) *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Vet Scand* 51: 15.
362. Donahue JM, Smith BJ, Redmon KJ, Donahue JK (1991) Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. *J Vet Diagn Invest* 3: 148-151.
363. Lees VW, Gale SP (1994) Titers to *Leptospira* species in horses in Alberta. *Can Vet J* 35: 636-340.
364. Hodgin EC, Miller DA, Lozano F (1989) *Leptospira* abortion in horses. *J Vet Diagn Invest* 1: 283-287.
365. Poonacha KB, Donahue JM, Giles RC, Hong CB, Petrites-Murphy MB, et al. (1993) Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Vet Pathol* 30: 362-369.
366. Szeredi L, Haake DA (2006) Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Vet Pathol* 43: 755-761.
367. Pinna AE, Martins G, Hamond C, Lilenbaum W, Medeiros MA (2011) Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. *Vet Microbiol* In Press, Corrected Proof.
368. Leon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, et al. (2006) Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J Vet Diagn Invest* 18: 218-221.
369. Hogan PM, Bernard WV, Kazakevicius PA, Fitzgerald MR (1996) Acute renal disease due to *Leptospira interrogans* in a weaning. *Equine Vet J* 28: 331-333.
370. Divers T, Byars TD, Shin SJ (1992) Renal dysfunction associated with infection of *Leptospira interrogans* in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 201: 1391-1392.
371. Williams RD, Morter RL, Freeman MJ, Lavignette AM (1971) Experimental chronic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 10: 948-954.
372. Sandmeyer LS, Grahn BH, Breaux CB (2007) Diagnostic ophthalmology. Anterior and posterior uveitis with inflammatory retinal detachment, most likely secondary to equine recurrent uveitis. *Can Vet J* 48: 97-98.
373. Wada S, Yoshinari M, Katayama Y, Anzai T, Wada R, et al. (2003) Nonulcerative keratouveitis as a manifestation of *Leptospiral* infection in a horse. *Vet Ophthalmol* 6: 191-195.

374. Brem S, Gerhards H, Wollanke B, Meyer P, Kopp H (1999) 35 leptospira isolated from the vitreous body of 32 horses with recurrent uveitis (ERU). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 112: 390-393.
375. Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H (2007) Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire. *J Vet Med A* 54: 270-275.
376. Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, et al. (2000) Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol* 38: 2731-2733.
377. Pearce JW, Galle LE, Kleiboeker SB, Turk JR, Schommer SK, et al. (2007) Detection of *Leptospira interrogans* DNA and antigen in fixed equine eyes affected with end-stage equine recurrent uveitis. *J Vet Diagn Invest* 19: 686-690.
378. Parma AE, Cerone SI, Sansinanea SA (1992) Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 33: 179-185.
379. Lucchesi PMA, Parma AE, Arroyo GH (2002) Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *BMC Microbiol* 2: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1472/1473>.
380. Alonso-Andicoberry C, García-Peña FJ, Pereira-Bueno J, Costas E, Ortega-Mora LM (2001) Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev Vet Med* 52: 109-117.
381. Collares-Pereira M (1991) Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. *Vet Rec* 128: 549-550.
382. Zacarias FGS, Vasconcellos SA, Anzai EK, Giraldi N, de Freitas JC, et al. (2008) Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 744-748.
383. Gamage CD, Koizumi N, Muto M, Nwafor-Okoli C, Kurukurusuriya S, et al. (2011) Prevalence and carrier status of leptospirosis in smallholder dairy cattle and peridomestic rodents in Kandy, Sri Lanka. *Vect Borne Zoo Dis* 11: [Epub ahead of print].
384. Guitian FJ, Garcia-Pena FJ, Oliveira J, Sanjuan ML, Yus E (2001) Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Vet Microbiol* 80: 275-284.
385. Kingscote BF (1985) The diagnosis of *Leptospira* serovar hardjo infection in cattle in Canada. *Can Vet J* 26: 270-274.

386. Lilenbaum W, Souza GN (2003) Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Vet Sci* 75: 249-251.
387. Prescott JF, Miller RB, Nicholson VM (1987) Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slaughter. *Can J Vet Res* 51: 229-231.
388. Schoonman L, Swai ES (2010) Herd- and animal-level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 3.
389. Feresu SB, Korver H, Riquelme N, Baranton GUY, Bolin CA (1996) Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis serogroup isolated from Zimbabwe cattle. *Int J Syst Bacteriol* 46: 694--698.
390. Feresu SB, Bolin CA, Korver H, Terpstra WJ (1994) Classification of leptospires of the Pyrogenes serogroup isolated from cattle in Zimbabwe by cross-agglutinin absorption and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Syst Bacteriol* 44: 541--546.
391. Gangadhar NL, Prabhudas K, Bhushan S, Sulthana M, Barbuddhe SB, et al. (2008) *Leptospira* infection in animals and humans: a potential public health risk in India. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 27: 885-892.
392. Suepaul S, Carrington C, Campbell M, Borde G, Adesiyun A (2011) Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Trop Anim Health Prod* 43: 367-375.
393. Escamilla HP, Martinez MJJ, Medina CM, Morales SE (2007) Frequency and cause of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *Can J Vet Res* 71: 314-317.
394. Grooms DL (2006) Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 66: 624-628.
395. André-Fontaine G, Kodjo A (2009) Leptospiroses et troubles de la reproduction chez les bovins. *Bull GTV* 48: 53-58.
396. Grégoire N, Higgins R, Robinson Y (1987) Isolation of leptospires from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. *Am J Vet Res* 48: 370-371.
397. Kingscote BF (1985) Leptospirosis in livestock. *Can Vet J* 26: 235-236.
398. Higgins RJ, Harbourne JF, Little TW, Stevens AE (1980) Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo. *Vet Rec* 107: 307-310.
399. Pearson JK, Mackie DP, Ellis WA (1980) Milk drop syndrome resulting from *Leptospira hardjo*. *Vet Rec* 106: 135-136.

400. Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZMM, et al. (2000) Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol* 73: 261-267.
401. Kiktenko VS, Balashov NG, Rodina VN (1976) Leptospirosis infection through insemination of animals. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 21: 207-213.
402. Oriel JD, Hayward AH (1974) Sexually-transmitted diseases in animals. *Br J Vener Dis* 50: 412-420.
403. Ciceroni L, Lombardo D, Pinto A, Ciarrocchi S, Simeoni J (2000) Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige - South Tyrol. *J Vet Med B* 47: 217-223.
404. Lilenbaum W, Varges R, Brandao FZ, Cortez A, de Souza SO, et al. (2008) Detection on *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* 69: 837-842.
405. Boqvist S, Thu HTV, Vagsholm I, Magnusson U (2002) The impact of *Leptospira* seropositivity on reproductive performance in sows in southern Vietnam. *Theriogenology* 58: 1327-1335.
406. Kessy MJ, Machang'u RS, Swai ES (2009) A microbiological and serological study of leptospirosis among pigs in the Morogo municipality, Tanzania. *Trop Anim Health Prod* [Epub ahead of print].
407. Naito M, Sakoda Y, Kamikawa T, Nitta Y, Hirose K, et al. (2007) Serological evidence of leptospiral infection in pig populations in different districts in Japan. *Microbiol Immunol* 51: 593-599.
408. Boqvist S, Chau BL, Gunnarsson A, Olsson Engvall E, Vågsholm I, et al. (2002) Animal- and herd-level risk factors for leptospiral seropositivity among sows in the Mekong delta, Vietnam. *Prev Vet Med* 53: 233-245.
409. Bolin CA (1994) Diagnosis of leptospirosis in swine. *Swine Health and Production* 2: 23-24.
410. Ellis WA (1986) Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with an abortion problem. *Vet Rec* 118: 563.
411. Bolin CA. Diagnosis and control of bovine leptospirosis; 2003 March 12-14; Reno, NV. pp. 155-159.
412. INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques) (2010) Bases de données. INSEE.

413. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) (2010) Tableau Economique de La Réunion (TER), Edition 2010. Paris, France. 237 p.
414. Météo France Site de Météo France Réunion.
415. Raunet M (1991) Physical environment and soils of Reunion. Consequences for effective agricultural and use [in French]; CIRAD-IRAT, editor. Montpellier, France: CIRADParis 438 p.
416. Centre National de Référence des Leptospiroses (2010) Activity report 2009 [in French]. Paris: Institut Pasteur.
417. Mailloux M, Debarbat F, Mollaret HH (1983) Leptospiroses in the island of Reunion. I. Human leptospiroses [in French]. Bull Soc Pathol Exot 76: 729-735.
418. Michault A (1998) Insularité et risque épidémiques à la Réunion. Bull Soc Pathol Exot 91: 52-55.
419. Centre National de Référence des Leptospire (2007) Activity report 2006 [in French]. Paris: Institut Pasteur.
420. Centre National de Référence des Leptospire (2004) Activity report 2003 [in French]. Paris: Institut Pasteur.
421. Centre National de Référence des Leptospire Activity report 2004 [in French]. Paris: Institut Pasteur.
422. Mailloux M (1980) Les leptospiroses humaines dans les D.O.M.-T.O.M. 10 années de bilans immunologiques (1970-1979). Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales 73: 229-238.
423. Desvars A, Gigan J, Hoarau G, Gérardin P, Favier F, et al. (2011) Seroprevalence of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) assessed by microscopic agglutination test on paper disc-absorbed whole blood. Am J Trop Med Hyg 85: 1097-1099.
424. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) (2010) Tableau Economique de Mayotte (TEM), Edition 2010. Mamoudzou: INSEE Mayotte. 70 p.
425. Laporte P, Michault A, Galtier J, Lefait-Robin R, Aucher P, et al. (1990) La leptospirose à Mayotte. Bull Soc Pathol Exot 83: 637--641.
426. van der Hoeden J, Szenberg E (1962) Infection with *Leptospira mini swajizak* in man and animals in Israel. Zoonoses Res 1: 251-276.

427. Souza Júnior MFd, Lobato ZIP, Lobato FCF, Moreira ÉC, Oliveira RRd, et al. (2006) Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 292-294.
428. Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, et al. (2010) Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS ONE* 5: e12637.
429. Comité Français de l'IUCN O (2011) Les vertébrés terrestres introduits en outre-mer et leurs impacts. Guide illustré des principales espèces envahissantes. Aurillac (France): UICN-ONCFS. 100 p.
430. Cheke A (2010) The timing of arrival of humans and their commensal animals on Western Indian Ocean oceanic islands. *Phelsuma* 18: 38--69.
431. Nicoll ME (2004) *Tenrec ecaudatus*, Tenrec, *Tandraka*, *Trandraka*. In: Goodman SM, Benstead JP, editors. *The Natural History of Madagascar*. Chicago and London: The University of Chicago Press. pp. 1283-1287.
432. Goodman SM, Jansen van Vuuren B, Ratrimomanarivo F, Probst J-M, Bowie RCK (2008) Specific status of populations in the Mascarene islands referred to *Mormopterus acetabulosus* (Chiroptera: Molossidae), with description of a new species. *J Mammal* 89: 1316-1327.
433. Moutou F (1982) Notes sur les chiroptères de l'île de La Réunion. *Mammalia* 46: 35-51.
434. Jones G, Teeling EC (2006) The evolution of echolocation in bats. *TRENDS in Ecology and Evolution* 21: 149-156.
435. Mittermeier RA, Ganzhorn JU, Konstant WR, Glander K, Tattersall I, et al. (2008) Lemur diversity in Madagascar. *International Journal of Primatology* 29: 19-38.
436. Desvars A, Duval T, Punelle C, Pascal M, Vourc'h G (2009) The flying-fox *Pteropus seychellensis* in Mayotte (Comoros): capture and blood sample methods. *J Wildl Dis* 45: 870--873.
437. Robert R (2001) Pluviométrie à l'île de la Réunion : des travaux de J. Defos du Rau (1960) à nos jours. *L'Information Géographique* 1: 53-59.
438. Lucchesi PMA, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC (2004) Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 131-134.
439. Czopowicz M, Kaba J, Smith L, Szalus-Jordanow O, Nowicki M, et al. (2011) Leptospiral antibodies in the breeding goat population of Poland. *Vet Rec* 169: 230.

440. Blatti S, Overesch G, Gerber V, Frey J, Hüsey D (2011) Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 153: 449-456.
441. Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplède A, et al. (2010) Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (*Mustelidae*, *Viverridae*) from southwestern France. *J Wildl Dis* 46: 1141-1151.
442. Agampodi SB, Peacock SJ, Thevanesam V, Nugegoda DB, Smythe L, et al. (2011) Leptospirosis outbreak in Sri Lanka in 2008: Lessons for assessing the global burden of disease. *Am J Trop Med Hyg* 85: 471-478.
443. Castro JRd, Salaberry SRS, Souza MAd, Lima-Ribeiro AMC (2011) Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Epub ahead of print]: 6-11.
444. de Freitas T, Keuroghlian A, Eaton D, de Freitas E, Figueiredo A, et al. (2010) Prevalence of *Leptospira interrogans* antibodies in free-ranging *Tayassu pecari* of the Southern Pantanal, Brazil, an ecosystem where wildlife and cattle interact. *Trop Anim Health Prod* 42: 1695-1703.
445. Kositanont U, Naigowit P, Imvithaya A, Singchai C, Puthavathana P (2003) Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand. *J Med Assoc Thai* 86: 136-142.
446. Laras K, Cao BV, Bounlu K, Nguyen TKT, Olson JG, et al. (2002) The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg* 67: 278-286.
447. Bustin SA (2010) Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods* 50: 217-226.
448. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622.
449. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, et al. (2005) Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 73: 4853-4863.
450. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B (2002) Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Infect Immun* 70: 2311-2318.
451. Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, et al. (2008) In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic

- domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun* 76: 2642-2650.
452. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, et al. (2002) The leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2037-2045.
 453. Luo D, Xue F, Ojcius DM, Zhao J, Mao Y, et al. (2009) Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. *Vaccine* In Press, Corrected Proof.
 454. Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, et al. (2005) Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun* 73: 4062-4069.
 455. Feng CY, Li QT, Zhang XY, Dong K, Hu BY, et al. (2009) Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against leptospira. *Braz J Med Biol Res* 42: 796-803.
 456. Lin X, Zhao J, Qian J, Mao Y, Pan J, et al. (2010) Identification of immunodominant B- and T-cell combined epitopes in outer membrane lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clin Vaccine Immunol* 17: 778-783.
 457. Cheema PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H, et al. (2007) Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. *Indian J Exp Biol* 45: 568-573.
 458. Mayer-Scholl A, Draeger A, Luge E, Ulrich R, Nöckler K (2010) Comparison of two PCR systems for the rapid detection of *Leptospira* spp. from kidney tissue. *Curr Microbiol* [Epub ahead of print].
 459. Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin OA (2006) Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Can J Microbiol* 52: 747-752.
 460. Bomfim MRQ, Barbosa-Stancioli EF, Koury MC (2008) Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *The Veterinary Journal* 178: 251-256.
 461. Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT (2003) Rapid detection of Herpes Simplex virus and Varicella-Zoster virus infections by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41: 1565-1568.
 462. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M (2011) Comparison of real-time PCR assays for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol* 49: 2154-2160.

463. Kwok-Keung K, Meiyun Wu S, Morin Nissom P, Oh SKW, Choo ABH (2008) Generation of high-level stable transgene expressing human embryonic stem cell lines using Chinese hamster elongation factor-1alpha promoter system. *Stem Cells Dev* 17: 825--836.
464. Cerqueira GM, McBride AJA, Queiroz A, Pinto LS, Silva EF, et al. (2010) Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. *Am J Trop Med Hyg* 82: 83-87.
465. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pérolat P, Baranton G (2000) Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol* 151: 333--341.
466. Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890.
467. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
468. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797.
469. Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
470. R Development Core Team (2006) R: A language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing.
471. Taylor KD (1975) Competitive displacement as a possible means of controlling commensal rodents on islands. *Ecological Bulletins* 19: 187-197.
472. Harper GA, Dickinson KJM, Seddon PJ (2005) Habitat use by three rat species (*Rattus* spp.) on Stewart Island/Rakiura, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 29: 251-260.
473. Barbehenn KR (1974) Recent invasions of Micronesia by small mammals. *Micronesica* 10: 41-50.
474. Reine NJ, Langston CE (2005) Urinalysis interpretation: How to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clin Tech Small Anim Pract* 20: 2-10.
475. Leroy J (2006) Comparaison des tests de dépistage rapide et de la mesure de la protéinurie chez le chien. Toujouse: Paul Sabatier. 72 p.

476. Jauréguiberry S, Roussel M, Brinchault-Rabin G, Gacouin A, Le Meur A, et al. (2005) Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 34 patients admitted to a single institution in metropolitan France. *Clin Microbiol Infect* 11: 391-394.
477. Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Mañé MC (2003) Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting of the urinary proteins. *J Comp Pathol* 129: 169-178.
478. Daher EDF, Abreu KLSd, Silva Junior GBd (2010) Leptospirosis-associated acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 32: 408-415.
479. Millan J, Candela MG, Lopez-Bao JV, Pereira M, Jimenez MA, et al. (2009) Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vect Borne Zoo Dis* 9: 549-554.
480. Sterling CR, Thiermann AB (1981) Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet Pathol* 18: 628-637.
481. Tucunduva de Faria M, Athanazio DA, Gonçalves Ramos EA, Silva EF, Reis MG, et al. (2007) Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J Comp Pathol* 137: 231-238.
482. Lefèvre A, Adler H, Lieber CS (1970) Effect of ethanol on ketone metabolism. *J Clin Invest* 49: 1775-1782.
483. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK (2002) Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 8: 1468-1473.
484. Ballenger L (1999) *Mus musculus*, Animal Diversity Web.
485. Wolff JO (2003) Density-dependence and the socioecology of space use in rodents. In: Design C, editor. *ACIAR Monograph 96, Rats, mice and people: rodent biology and management*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. pp. 124-130.
486. Russell J, Ringler D, Trombini A, Le Corre M (2011) The island syndrome and population dynamics of introduced rats. *Oecologia* 167: 667-676.
487. Pascal M, Lorvelec O, Borel G, Rosine A (2004) Structures spécifiques des peuplements de rongeurs d'agro-écosystèmes et d'écosystèmes "naturels" de la Guadeloupe et de la Martinique. *Rev Ecol (Terre et Vie)* 59: 283-292.
488. Russell JC, Abdelkrim J, Fewster RM (2009) Early colonisation population structure of a Norway rat island invasion. *Biological Invasions* 14: 2923-2931.

489. Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR) (2011) La conservation de l'Echenilleur de La Réunion par le contrôle des rats dans le massif de la Roche Ecrite: Synthèse des travaux 2010-2011 (action A1) du programme LIFE+CAP DOM Saint-André, La Réunion, France.
490. Wisseman CL, Traub R, Gochenour WS, Smadel JE, Lancaster WE (1955) Leptospirosis of man and animals in urban, rural and jungle areas of southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg* 4: 29-40.
491. Santos CS, Macedo JIO, Bandeira M, Chagas-Junior AD, McBride AJA, et al. (2010) Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. *J Med Microbiol* 59: 1101-1106.
492. Day TD, Waas JR, O'Connor CE, Carey PW, Matthews LR, et al. (1997) Leptospirosis in brushtail possums: is *leptospira interrogans* serovar *balcanica* environmentally transmitted? *J Wildl Dis* 33: 254-260.
493. Cirone SM, Riemann HP, Ruppanner R, Behymer DE, Franti CE (1978) Evaluation of the hemagglutination test for epidemiologic studies of leptospiral antibodies in wild mammals. *J Wildl Dis* 14: 193-202.
494. Shimizu MM (1984) Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, island of Hawaii. *Int J Zoonoses* 11: 173-188.
495. Pereira MM, Andrade J (1988) Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospires and specific antibodies in rodents. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 768-770.
496. Rahelinirina S, Léon A, Harstkeerl RA, Sertour N, Ahmed A, et al. (2010) First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* 5: e14111.
497. Natarajaseenivasan K, Vedhagiri K, Sivabalan V, Prabakaran SG, Sukumar S, et al. (2011) Seroprevalence of *Leptospira borgpetersenii* serovar *javanica* infection among dairy cattle, rats and humans in the Cauvery river valley of southern India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 42: 679-686.
498. Johnson MAS, Smith H, Joseph P, Gilman RH, Bautista CT, et al. (2004) Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis* 10: 1016-1022.
499. Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD (2003) Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev Vet Med* 60: 227-235.

500. Athanzio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, et al. (2008) *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop* 105: 176-180.
501. da Silva EF, Félix SR, Cerqueira GM, Fagundes MQ, Neto ACPS, et al. (2010) Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. *Am J Trop Med Hyg* 83: 336-337.
502. Saadi MA, Post G (1976) Rodent leptospirosis in Colorado. *J Wildl Dis* 12: 315-317.
503. Collares-Pereira M, Korver H, Terpstra WJ, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, et al. (1997) First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *Eur J Epidemiol* 13: 435--441.
504. Mohamed-Hassan SN, Bahaman AR, Mutalib AR, Khairani-Bejo S (2010) Serological prevalence of leptospiral infection in wild rats at the National Service Training Centres in Kelantan and Terengganu. *Trop Biomed* 27: 30-32.
505. Blanchard RJ, Blanchard CB (1977) Aggressive behavior in the rat. *Behav Biol* 21: 197-224.
506. Douchawee G, Phulsuksombat D, Naigowit P, Khoaprasert Y, Sangjun N, et al. (2005) Survey of leptospirosis of small mammals in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 1516-1522.
507. Lench J, Yahnke C (2004) *Suncus murinus*, Animal Diversity Web.
508. Aslantas O, Ozdemir V, Kiliç S, Babür C (2005) Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol* 129: 187-191.
509. Brethes B, Puech PL, Fraisse A, Dubois P, Domenech J, et al. (1988) Leptospiroses et environnement. Etude des deux foyers majeurs de Nouvelle-Calédonie. *Rev Epidemiol Santé Publique* 36: 436-442.
510. Jimenez-Coello M, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo MF, Rodríguez-Buenfil JC, Ortega-Pacheco A (2008) Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. *Acta Trop* 106: 22-26.
511. Adesiyun AA, Hull-jackson C, Mootoo N, Halsall S, Bennett R, et al. (2006) Seroepidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implications for vaccination and public health. *J Vet Med B* 53: 91-99.
512. Myburgh JG, Posnett SJ, Lawrence JV (1993) Serological survey for canine leptospirosis in the Pretoria area. *J S Afr Vet Assoc* 64: 37-38.

513. Everard CO, Cazabon EP, Dreesen DW, Sulzer CR (1979) Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad: West Indies. *Int J Zoonoses* 6: 33-40.
514. Glass GE, Gardner-Santana LC, Holt RD, Chen J, Shields TM, et al. (2009) Trophic garnishes: cat-rat interactions in an urban environment. *PLoS ONE* 4: e5794.
515. Raghavan R, Brenner K, Higgins J, Van der Merwe D, Harkin KR (2011) Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Prev Vet Med* In Press, Corrected Proof.
516. Ryu E (1975) An investigation of canine antileptospiral antibodies in Japan. *Int J Zoonoses* 2: 16-34.
517. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2006) Brief report: Leptospirosis after flooding of a university campus--Hawaii, 2004. *Morb Mortal Wkly Rep* 55: 125-127.
518. Liverpool J, Francis S, Liverpoll CE, Dean GT, Mendez DD (2008) Leptospirosis: case reports of an outbreak in Guyana. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 239-245.
519. Talpada MD, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM (2003) Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implication for transmission to humans. *Vect Borne Zoo Dis* 3: 141-147.
520. Szyfres B (1976) Leptospirosis as an animal and public health problem in latin America and the Caribbean area. *PAHO Bull* 10: 110-125.
521. Katz AR, Manea SJ, Sasaki DM (1991) Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. *Am J Public Health* 81: 1310-1312.
522. Martins G, Penna B, Lilenbaum W (2010) Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. *Vet Rec* 167: 629-630.
523. Leon LL, Garcia RC, Diaz CO, Valdez RB, Carmona GCA, et al. (2008) Prevalence of leptospirosis in dairy cattle from small rural production units in Toluca Valley, state of Mexico. *Ann N Y Acad Sci* 1149: 292-295.
524. Jimenez-Coello M, Ortega-Pacheco A, Guzman-Marin E, Guiris-Andrade DM, Martinez-Figueroa L, et al. (2009) Stray dogs as reservoirs of the zoonotic agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an urban area of Chiapas in Southern Mexico. *Vect Borne Zoo Dis* 10: 135-141.
525. Thompson JA, de Miranda Henriques Leite R, Gonçalves VSP, Leite RC, Bandeira DA, et al. (2006) Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Prev Vet Med* 76: 290-301.

526. Ellis WA (1994) Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10: 463-478.
527. Hadad E, Pirogovsky A, Bartal C, Gilad J, Barnea A, et al. (2006) An outbreak of leptospirosis among Israeli troops near the Jordan River. *Am J Trop Med Hyg* 74: 127-131.
528. Belmaker I, Alkan M, Barnea A, Dukhan L, Yitzhaki S, et al. (2004) Risk of transmission of leptospirosis from infected cattle to dairy workers in Southern Israel. *Isr Med Assoc J* 6: 24-27.
529. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Corney BG, Smythe LD (2007) Epidemiology of *Leptospira weilii* serovar Topaz infections in Australia. *Commun Dis Intell* 31: 216-222.
530. Lage AP, Leite RMH, Thompson JA, Bandeira DA, Herrmann GP, et al. (2007) Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the state of Paraiba, Brazil. *Arq Inst Biol, Sao Paulo* 74: 185-190.
531. Odontsetseg N, Sakoda Y, Kida H (2005) Serological evidence of the persistence of infection with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in cattle in Mongolia. *Microbiol Immunol* 49: 865-869.
532. Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Jones RT, Cutler RS, et al. (1998) Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona slaughtered in abattoirs in Victoria, Australia. *Vet Microbiol* 62: 235-242.
533. Oliveira AA, Mota RA, Pereira GC, Langoni H, Souza MI, et al. (2001) Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. *Onderstepoort J Vet Res* 68: 275-279.
534. Shafighi T, Abdollahpour G, Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H (2010) Serological and bacteriological study of leptospirosis in slaughtered cattle in north of Iran (Rasht). *African Journal of Microbiological Research* 4: 2118-2121.
535. Langoni H, de Souza LC, da Silva AV, Luvizotto MCR, Paes AC, et al. (1999) Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev Vet Med* 40: 271-275.
536. Atxaerandio R, Aduriz G, Ziluaga I, Esteban JI, Maranda L, et al. (2005) Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *Vet Rec* 156: 376-380.
537. Prescott JF, Miller RB, Nicholson VM, Martin SW, Lesnick T (1988) Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Can J Vet Res* 52: 210-215.

538. Martins G, Penna B, Hamond C, Leite R, Silva A, et al. (2011) Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Anim Health Prod* [Epub ahead of print].
539. Sattler N, Fecteau G, Couture Y, Tremblay A (2001) Evaluation des équilibres potassiques chez la vache laitière et étude de ses variations journalières et selon le stade de production. *Can Vet J* 42: 107-115.
540. Martins G, Penna B, Lilenbaum W (2011) Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Anim Health Prod* [Epub ahead of print].
541. Tillard E (2007) Approche globale des facteurs associés à l'infertilité et l'infécondité chez la vache laitière: importance relative des facteurs nutritionnels et des troubles sanitaires dans les élevages de l'île de la Réunion: Montpellier II. 484 p.
542. Leal-Castellanos CB, García-Suárez R, González-Figueroa E, Fuentes-Allen JL, Escobedo-de la Peñal J (2003) Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. *Epidemiol Infect* 131: 1149-1156.
543. Vinodh R, Raj GD, Govindarajan R, Thiagarajan V (2008) Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Trop Anim Health Prod* 40: 323-329.
544. Lilenbaum W, Vargas R, Medeiros L, Cordeiro AG, Cavalcanti A, et al. (2008) Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Res Vet Sci* 84: 14-17.
545. Tripathy DN, Hanson LE, Mansfield ME, Thilsted JP (1985) Experimental infection of lactating goats with *Leptospira interrogans* serovars pomona and hardjo. *Am J Vet Res* 46: 2512-2514.
546. Tripathy DN, Hanson LE, Bedoya M, Mansfield ME (1985) Experimental infection of pregnant and lactating goats with *Leptospira interrogans* serovars hardjo and szwajizak. *Am J Vet Res* 46: 2515-2518.
547. dos Santos J, Lima-Ribeiro A, Oliveira P, dos Santos M, Júnior Á, et al. (2011) Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Trop Anim Health Prod* [Epub ahead of print]: 1-6.
548. Levett PN, Whittington, C.U., Camus, E. (1996) Serological survey of leptospirosis in livestock animals in the lesser Antilles. *Ann N Y Acad Sci* 791: 369-377.
549. Grant GH, Smith GCE, Schloss W (1988) Seroprevalence of leptospiral antibodies in the Jamaican livestock population. *Vet Rec* 122: 419-420.

550. Leon-Vizcaino L, Hermoso de Mendoza M, Garrido F (1987) Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 10: 149-153.
551. Keenan J, Ervin G, Aung M, McGwin G, Jolly P (2010) Risk factors for clinical leptospirosis from Western Jamaica. *Am J Trop Med Hyg* 83: 633-636.
552. Milner AR, Wilks CR, Spratt DM, Presidente PJ (1981) The prevalence of anti-leptospiral agglutinins in sera of wildlife in southeastern Australia. *J Wildl Dis* 17: 197-202.
553. Perez J, Goarant C (2010) Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol* 10: 325.
554. Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM, Smythe LD, et al. (2011) Serosurvey of leptospirosis and investigation of a possible novel serovar Arborea in farmed deer in New Zealand. *N Z Vet J* 59: 139-142.
555. Ayanegui-Alcérreca MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins-Emerson JM, Heuer C, et al. (2010) Regional seroprevalence of leptospirosis on deer farms in New Zealand. *N Z Vet J* 58: 184-189.
556. Niwetpathomwat A, Luengyosluechakul S, Geawduanglek S (2006) A serological investigation of leptospirosis in sows from central Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37: 716-719.
557. Everard COR, Cawich F, Gamble PG, Everard JD (1988) Prevalence of leptospirosis in Belize. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 495-499.
558. Bahaman AR, Ibrahim AL, Adam H (1987) Serological prevalence of leptospiral infection in domestic animals in West Malaysia. *Epidemiol Infect* 99: 379-392.
559. Boqvist S, Ho Thi VT, Magnusson U (2005) Annual variations in *Leptospira* seroprevalence among sows in southern Vietnam. *Trop Anim Health Prod* 37: 443-449.
560. Paz-Soldan SV, Dianderas MT, Windsor RS (1991) *Leptospira interrogans* serovar canicola: a causal agent of sow abortions in Arequipa, Peru. *Trop Anim Health Prod* 23: 233-240.
561. Elbers AR, van Rossem H, Schukken YH, Martin SW, van Exsel AC, et al. (1994) Return to oestrus after first insemination in sow herds (incidence, seasonality, and association with reproductivity and some blood parameters). *Vet Q* 16: 100-109.
562. Dewey CE, Martin SW, Friendship RM, Kennedy B (1992) A Delphi exercise used to identify potential causes of variation in litter size of Ontario swine. *Can Vet J* 33: 40-45.

563. Boqvist S, Montgomery JM, Hurst M, Thu HTV, Engvall EO, et al. (2003) *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Vet Microbiol* 93: 361-368.
564. Martinez J, Segales J, Aduriz G, Atxaerandio R, Jaro P, et al. (2006) Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. *Res Vet Sci* 81: 92-98.
565. Berlioz-Arthaud A, Guillard B, Goarant C, Hem S (2010) Surveillance active de la leptospirose humaine en milieu hospitalier au Cambodge. *Bull Soc Pathol Exot* 103: 111-118.
566. Van CT, Thuy NT, San NH, Hien TT, Baranton G, et al. (1998) Human leptospirosis in the Mekong delta, Viet Nam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 625-628.
567. Alexander AD, Smith DJ (1962) *Leptospira robinsoni*, a new serotype of the pyrogenes serogroup. *Aust J Exp Biol Med Sci* 40: 81-84.
568. Roth EE, Adams MW, Greer B, Sanford GE, Moore M, et al. (1963) New leptospiral serotype in the pyrogenes serogroup. *Public Health Rep* 78: 727-730.
569. Feresu SB, Bolin CA, Korver H, Terpstra WJ (1994) Classification of leptospires of the Pyrogenes serogroup isolated from cattle in Zimbabwe by cross-agglutinin absorption and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Syst Bacteriol* 44: 541-546.
570. McClintock CS, McGowan MR, Corney BG, Colley J, Smythe L, et al. (1993) Isolation of *Leptospira interrogans* serovars hardjo and zannoni from a dairy herd in north Queensland. *Aust Vet J* 70: 393-394.
571. Emanuel ML, Mackerras IM, Smith DJW (1964) The epidemiology of leptospirosis in North Queensland. I. General survey of animal hosts. *J Hygiene (Cambridge)* 62: 451-484.
572. Cisneros Puebla MA, Moles Cervantes LP, Rosas DG, Serranía NR, Torres Barranca JI (2002) Diagnostic serology of swine leptospirosis in Mexico 1995-2000 [in Spanish]. *Rev Cubana Med Trop* 54: 28-31.
573. Rocha T (1998) A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 17: 699-712.
574. Vashi N, A., Reddy P, Wayne D, B., Sabin B (2010) Bat-associated leptospirosis. *J Gen Intern Med* 25: 162-164.
575. Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, et al. (2000) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg* 63: 255-258.

576. Matthias MA, Diaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR, et al. (2005) Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 73: 964--974.
577. Tulsiani SM, Cobbold RN, Graham GC, Dohnt MF, Burns M-A, et al. (2011) The role of fruit bats in the transmission of pathogenic leptospires in Australia. *Ann Trop Med Parasitol* 105: 71--84.
578. Lourdault K, Aviat F, Picardeau M (2009) Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol* 58: 648-655.
579. Pereira MM, Da Silva JJP, Pinto MA, Da Silva MF, Machado MP, et al. (2005) Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 72: 13--20.
580. Bonilla-Santiago R, Nally JE (2011) Rat model of chronic leptospirosis. *Current Protocols in Microbiology* Chapter 12: 12E.13.11-12E.13.18.
581. Monahan AM, Miller, I. S., Nally, J. E. (2009) Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol* 107: 707-716.
582. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C (2011) Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1361.
583. Hathaway SC, Blackmore DK, Marshall RB (1981) Leptospirosis in free-living species in New Zealand. *J Wildl Dis* 17: 489-496.
584. Gorresen PM, Willig MR (2004) Population and community-level responses of phyllostomid bats to landscape structure: the importance of scale. *J Mammal* 85: 688-697.
585. Aplin KP, Suzuki H, Chinen AA, Chesser RT, ten Have J, et al. (2011) Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of black rats. *PLoS ONE* 6: e26357.
586. Luniak M. Synurbization - adaptation of animal wildlife to urban development. In: Shaw W, Harris LK, Vandruff L, editors; 2004; Tucson (Arizona). pp. 50-55.
587. Tarnaud L, Simmen B (2002) A major increase in the population of brown lemurs on Mayotte since the decline reported in 1987. *Oryx* 36: 297--300.
588. Tonnabel J, Tattersall I, Simmen B, Tarnaud L (2011) Decline and demographic changes in the population of the Near Threatened brown lemur *Eulemur fulvus* on Mayotte. *Oryx* 45: 608--614.

589. Tollenaere C, Brouat C, Duplantier JM, Rahalison L, Rahelinirina S, et al. (2010) Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *J Biogeog* 37: 398--410.
590. Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J, et al. (2010) Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 42: 126--128.
591. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, et al. (2006) First record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami Islands, Japan. *Microbiol Immunol* 50: 429--434.
592. Vedhagir K, Natarajaseenivasan K, Prabhakaran SG, Selvin J, Narayanan R, et al. (2010) Characterization of *Leptospira borgpetersenii* isolates from field rats (*Rattus norvegicus*) by 16S rRNA and LipL32 gene sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 150-157.
593. Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, et al. (2009) Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J Med Microbiol* 58: 1227--1230.
594. Kurtenbach K, Hanincová J, Kr, Tsao JI, Margos G, Fish D, et al. (2006) Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Micro* 4: 660-669.
595. Levene H (1953) Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *American Naturalist* 87: 331-333.
596. Chan K-S, Kosoy M (2010) Analysis of multi-strain *Bartonella* pathogens in natural host population - Do they behave as species or minor genetic variants? *Epidemics* 2: 165-172.
597. Murray CK, Gray MR, Mende K, Parker TM, Samir A, et al. (2011) Use of patient-specific *Leptospira* isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic agglutination testing (MAT). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 209-213.
598. Romero EC, Caly CR, Yasuda PH (1998) The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 40: 183-184.
599. Everard COR, Bennett S (1990) Persistence of leptospiral agglutinins in Trinidadian survey subjects. *Eur J Epidemiol* 6: 40-44.
600. Blackmore DK, Schollum LM, Moriarty KM (1984) The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *N Z Med J* 97: 83-86.

601. Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF (2011) Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. J Vet Intern Med [Epub ahead of print].
602. Barmettler R, Schweighauser A, Bigler S, Grooters AM, Francey T (2011) Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. J Am Vet Med Assoc 238: 183-188.
603. Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayaki K, Raja SSS, Ratnam S (2004) Human leptospirosis in Erode, South India: serology, isolation, and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. Jpn J Infect Dis 57: 193-197.
604. Aguirre AA, Keefe TJ, Reif JS, Kashinsky L, Yochem PK, et al. (2007) Infectious disease monitoring of the endangered hawaiian monk seal. J Wildl Dis 43: 229-241.
605. Thurmond MC, Picanso JP, Hietala SK (1990) Prospective serology and analysis in diagnosis of dairy cow abortion. J Vet Diagn Invest 2: 274-282.
606. Galton MM (1962) Methods in the laboratory diagnosis of leptospirosis. Ann N Y Acad Sci 98: 675-685.
607. de Azevedo SS, Alves CJ, de Andrade JSL, dos Santos FA, Freitas TD, et al. (2004) Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. Arq Inst Biol, Sao Paulo 71: 383-385.
608. Kingscote BF (1969) Leptospirosis survey in a white-tailed deer herd in Ontario: comparative use of fluid and paper disc-absorbed blood. J Wildl Dis 5: 68--72.
609. Fenollar F, Raoult D (1999) Diagnosis of rickettsial diseases using samples dried on blotting paper. Clin Diagn Lab Immunol 6: 483-488.
610. Ferraz A, Belo E, Coutinho L, Oliveira A, Carmo A, et al. (2008) Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in *Neisseria meningitidis* serotyping by Dot-blot ELISA. BMC Infect Dis 8: 30.
611. Handali S, Rodriguez S, Noh J, Gonzalez AE, Garcia HH, et al. (2007) A simple method for collecting measured whole blood with quantitative recovery of antibody activities for serological surveys. J Immunol Methods 320: 164-171.
612. Everard CO, Maude GH, Hayes RJ (1990) Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. Ann Trop Med Parasitol 84: 255-266.
613. Demeke T, Jenkins G (2010) Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Anal Bioanal Chem 396: 1977-1990.

614. Cheke A, Hume J (2008) *Lost Land of the Dodo*. London: T & AD Poyser and A&C Black Publishers. 480 p.
615. Liceras de Hidalgo J, Sulzer KR (1984) Six new leptospiral serovars isolated from wild animals in Peru. *J Clin Microbiol* 19: 944-945.
616. Mgone GF, Machang'u RS, Goris MGA, Engelbert M, Sondji S, et al. (2006) New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 593-597.
617. Jones CJ, Sulzer KR, Everard CO, Vaughn AW, Innis VA (1984) Bim, a new serovar of *Leptospira interrogans* isolated from a dog in Barbados. *J Clin Microbiol* 19: 946.
618. Gladieux P, Guérin F, Giraud T, Caffier V, Lemaire C, et al. (2011) Emergence of novel fungal pathogens by ecological speciation: importance of the reduced viability of immigrants. *Mol Ecol* 20: 4521-4532.
619. Giraud T, Gladieux P, Gavrillets S (2010) Linking the emergence of fungal plant diseases and ecological speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 387-395.
620. Poulin R, Morand S (2000) The diversity of parasites. *The Quarterly Review of Biology* 75: 277-293.
621. Feresu SB (1992) Isolation of *Leptospira interrogans* from kidneys of Zimbabwe beef cattle. *Vet Rec* 130: 446--448.
622. Feresu SB, Bolin A, Van de Kemp H, Korver H (1999) Identification of a serogroup bataviae *Leptospira* strain isolated from an ox in Zimbabwe. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289: 19--29.
623. Feresu SB, Bolin CA, Korver H (1998) A new leptospiral serovar, ngavi, in the Tarassovi serogroup isolated from Zimbabwe oxen. *Int J Syst Evol Microbiol* 48: 207-213.
624. Dikken H, Timmer VEA, Njenga R (1981) Three new leptospiral serovars from Kenya. *Trop Geogr Med* 33: 343--346.
625. Muzzi A, Donati C (2011) Population genetics and evolution of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol* [Epub ahead of print].
626. Takuno S, Kado T, Sugino RP, Nakhleh L, Innan H (2011) Population genomics in Bacteria: A case study of *Staphylococcus aureus*. *Mol Biol Evol* [Epub ahead of print].
627. Mayr E (1954) Changes of genetic environment and evolution. In: Huxley J HA, Ford EB, editor. *Evolution as a Process*. London: Allen & Unwin. pp. 157-180.

628. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel J-P (2011) An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. *Immunol Rev* 240: 211-234.
629. Shames SR, Auweter SD, Finlay BB (2009) Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 380-389.
630. Kilpatrick AM (2011) Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* 334: 323-327.
631. Barreiro LB, Quintana-Murci L (2010) From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nature Reviews Genetics* 11: 17-30.
632. Weinstein P, Judge D, Carver S (2011) Biological and cultural coevolution and emerging infectious disease: Ross River virus in Australia. *Med Hypotheses* 76: 893-896.
633. Woolhouse MEJ, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR (2002) Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* 32: 569-577.
634. Thomson EC, Smith JA, Klenerman P (2011) The natural history of early hepatitis C virus evolution; lessons from a global outbreak in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *J Gen Virol* 92: 2227-2236.
635. Waller AS, Paillot R, Timoney JF (2011) *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *J Med Microbiol* 60: 1231-1240.
636. Quintana-Murci L, Alcaïs A, Abel L, Casanova J-L (2007) Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nat Immunol* 8: 1165-1171.
637. Quintana-Murci L, Barreiro LB (2010) The role played by natural selection on Mendelian traits in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1214: 1-17.
638. Casanova J-L, Abel L, Quintana-Murci L (2011) Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 29: 447-491.
639. Nesse RM, Williams GC (1994) *Why We Get Sick – The New Science of Darwinian Medicine*. New York, USA: Times Book. 304 p.
640. Soares TSM, Latorre MdRrDdO, Laporta GZ, Buzzar MR (2010) Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo, Southeastern Brazil, 1998 to 2006. *Rev Saude Publica* 44: 283-291.

641. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (2010) Tableau économique de Mayotte: INSEE. 130 p.
642. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (2010) La Revue «Économie de La Réunion». INSEE.
643. Costa E, Costa YA, Lopes AA, Sacramento E, Bina JC (2011) Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 261-267.
644. Romero EC, Bernardo CC, Yasuda PH (2003) Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 245-248.
645. de Figueiredo CM, Mourão AC, de Oliveira MA, Alves WR, Ooteman MC, et al. (2001) Human leptospirosis in Belo Horizonte City, Minas Gerais, Brazil: a geographic approach [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 331-338.
646. Abdelkrim J, Pascal M, Samadi S (2005) Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Mol Ecol* 14: 2923-2931.
647. Henry RA, Johnson RC (1978) Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. *Appl Environ Microbiol* 35: 492-499.
648. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake DA (2004) Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7: 35-40.
649. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, et al. (2008) Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154: 1309-1347.
650. Viau EJ, Boehm AB (2011) Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams. *J Water Health* 9: 637-346.
651. Schmidt DR, Winn RE, Keefe TJ (1989) Leptospirosis. Epidemiological features of a sporadic case. *Arch Intern Med* 149: 1878-1880.
652. Prescott J (2011) Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Vet Rec* 169: 187-188.
653. Vincent C, Munger C, Labrecque O, Lévesque IJ, Desjardins F (2007) La leptospirose : cas de transmission d'un chien à un humain. *Raizo, bulletin zoosanitaire*. pp. 5.
654. Jansen A, Schneider T (2011) Weil's disease in a rat owner. *The Lancet Infectious Diseases* 11: 152.

655. Stokes JE, Kaneene JB, Schall WD, Kruger JM, Miller R, et al. (2007) Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 230: 1657-1664.
656. Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK (2005) Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am J Vet Res* 66: 1780-1784.
657. Brem S, Kopp H, Meyer P (1990) *Leptospira* antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988 [in German]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 103: 6-8.
658. Hartman EG (1984) Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Serie A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* 258: 350-359.
659. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, et al. (2000) Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 19: 86-94.
660. Kemenes F (1964) Cross immunity studies on virulent strains of leptospires belonging to different serotypes. *Zeitschrift für Immunitäts- und Allergieforschung* 127: 209-229.
661. Adler B, Faine S (1978) The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J Med Microbiol* 11: 387-400.
662. Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM (2011) Vaccination for leptospirosis improved the weaning percentage of 2-year-old farmed red deer hinds in New Zealand. *N Z Vet J* 59: 191-196.
663. Menges RW (1959) Control of leptospirosis in man and animals. *Public Health Rep* 74: 149-152.
664. Alexopoulos C, Fthenakis GC, Burriel A, Bourtzi-Hatzopoulou E, Kritas SK, et al. (2003) The effects of the periodical use of in-feed chlortetracycline on the reproductive performance of gilts and sows of a commercial pig farm with a history of clinical and subclinical viral and bacterial infections. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 187-192.
665. Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassels JA (1986) Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Vet Rec* 118: 11-13.
666. Ellis WA, Cassels JA, Doyle J (1986) Genital leptospirosis in bulls. *Vet Rec* 118: 333.

667. Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L (2011) Leptospire infections in pigs: epidemiology, diagnostics and worldwide occurrence [in German]. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 345-359.
668. Masri SA, Nguyen PT, Gale PS, Hoxard CJ, Jung S-C (1997) A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira spp.* in bovine semen. Can J Vet Res 61: 15-20.
669. Althouse GC, Rossow K (2011) The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. Reproduction in Domestic Animals 46: 64-67.
670. Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, et al. (2008) Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. Theriogenology 70: 1337-1345.
671. Hunter P, van der Vyver FH, Selmer-Olsen A, Henton MM, Herr S, et al. (1987) Leptospirosis as a cause of "white spot" kidney in South African pig abattoirs. Onderstepoort J Vet Res 54: 59-62.
672. Wang QK, Zhang JG, Du R, Wang SZ, Wilson P (1999) Observations of renal histopathology associated with leptospirosis in farmed deer. Journal of Jilin Agricultural University 21: 63-65.
673. Uzal FA, Dobrenov B, Smythe L, Norris M, Dohnt M, et al. (2002) A study of "white spotted kidneys" in cattle. Vet Microbiol 86: 369-375.
674. Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Mead LJ, Jones RT, et al. (1992) Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. Vet Microbiol 30: 151-163.
675. Delbem ACB, de Freitas JC, Bracarense APFRL, Müller EE, de Oliveira RC (2002) Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. Brazilian Journal of Microbiology 33: 174-177.
676. Souza VM, Arsky MD, Castro AP, Araujo WN (2011) Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil [in Portuguese]. Rev Saude Publica 45: 1001-1008.
677. Grollier B, Soufflet O (2011) Lutter contre les ravageurs. Caro Canne.
678. Wang Z, Jin L, Wegrzyn A (2007) Leptospirosis vaccines. Microbial Cell Factories 6: 39.
679. Parker J, Walker M (2011) Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. Vet Microbiol In Press, Corrected Proof.

680. Howald G, Donlan CJ, Galvan JP, Russell JC, Parkes J, et al. (2007) Invasive rodent eradication on islands. *Conserv Biol* 21: 1258-1268.
681. Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW (2002) Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect* 128: 29-36.
682. Tollenaere C, Duplantier JM, Rahalison L, Ranjalahy M, Brouat C (2011) AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection. *Mol Ecol* 20: 1026-1038.
683. Male D (1998) *Immunologie. Aide-mémoire illustré*. Paris, Bruxelles: DeBoeck Université. 129 p.
684. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, et al. (2007) Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 13: 1-46.

